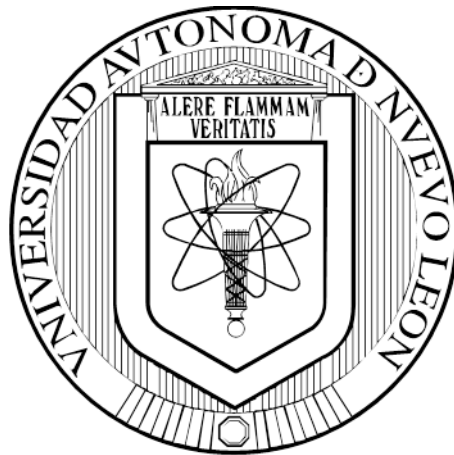


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO DE ANEUPLOIDÍAS
FETALES A PARTIR DE LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL
PROTEÓMICO DEL SUERO MATERNO**

POR

GRACIELA ARELÍ LÓPEZ URIARTE

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN MEDICINA**

MARZO, 2019

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO DE ANEUPLOIDÍAS
FETALES A PARTIR DE LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL
PROTEÓMICO DEL SUERO MATERNO**

POR

GRACIELA ARELÍ LÓPEZ URIARTE

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN MEDICINA**

MARZO, 2019

DIAGNÓSTICO PRENATAL NO INVASIVO DE ANEUPLOIDÍAS FETALES
A PARTIR DE LA DETERMINACIÓN DEL PERFIL PROTEÓMICO
DEL SUERO MATERNO

Aprobación de tesis:

Dra. med. Laura Elia Martínez de Villarreal
Directora de tesis

Dr. en C. Víctor Manuel Torres de la Cruz
Co-Director de tesis

Dr. med. Abel Guzmán López
Comisión de tesis

Dra. med. Consuelo Treviño Garza
Comisión de tesis

Dr. med. Flavio Hernández Castro
Comisión de tesis

Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

Después de ver terminado este proyecto que inició originalmente para desarrollar una tesis de especialidad en Genética Médica y verlo continuar ahora como línea de investigación consolidada, me encuentro sumamente satisfecha desde el punto de vista académico, al haber obtenido resultados prometedores en la generación de nuevo conocimiento, abriendo otras opciones para seguir en el estudio de las enfermedades genéticas desde etapa prenatal.

Lejos de culminar el tema y cerrarlo como mi tesis del Doctorado en Medicina, ha sido una oportunidad muy valiosa para mí el ganar experiencia en el manejo de las pacientes en una etapa de suma vulnerabilidad como lo es un embarazo, aunado a que son gestaciones de alto riesgo por las alteraciones que se han detectado durante su curso. Así que el principal agradecimiento es para ellas, mis pacientes y sus familias, que depositaron su confianza en el equipo de Genética para atender cada una de sus situaciones. Si bien el resultado en todas estas gestaciones no fue el que todos y ellas mismas hubieran deseado, estoy segura que el acompañamiento que se realizó con cada una logró formar un vínculo muy particular para compartir no sólo aspectos médicos sino también aspectos de vida, de creencias y de esperanza.

Doy gracias a mis maestros, la Dra. Laura Martínez y el Dr. Víctor Torres, quienes estuvieron guiándome en cada momento, supervisando todas las acciones antes, durante y después del proyecto, he aprendido mucho de Uds. en la manera de conducirme en mis actividades docentes, asistenciales y evidentemente, de investigación; los admiro enormemente, ha sido un honor ser su alumna y estoy orgullosa de pertenecer al Departamento de Genética.

Gracias a mis compañeras de trabajo: Liliana Romero, Viviana Gómez, Gloria García, Carmen Quezada, Laura Moreno e Iris Torres, por el procesamiento de las muestras biológicas manejadas con las más altas normas de calidad en los laboratorios de Proteómica, Citogenética y Biología Molecular; y a Guadalupe Manrique, Azalia Ayala y Yareli Lozano, quienes fueron la puerta de entrada para recibir a las pacientes, sus atenciones permitieron comenzar a trabajar juntos como equipo que somos.

Gracias también a mis alumnos, Magdalena Medina y Carlos Burciaga, por su dedicación, esfuerzo y apoyo incondicional en la realización de este proyecto hasta su culminación.

Agradezco a mi familia y a mis amigos, quienes estuvieron al pendiente en estos años dando palabras de apoyo e ideas útiles para resolver problemas. Para terminar, agradezco a mi esposo Efraín, por ser mi mástil en los momentos de mayor flaqueza cuando el proyecto parecía no tener salida. A todos, muchísimas gracias.

CONTENIDO

	Página
CAPÍTULO I	
1. RESUMEN.....	1
CAPÍTULO II	
2. INTRODUCCIÓN.....	5
2.1 Antecedentes	5
2.2 Justificación	20
CAPÍTULO III	
3. HIPÓTESIS.....	21
CAPÍTULO IV	
4. OBJETIVOS.....	22
CAPÍTULO V	
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 Tipo de estudio.....	23
5.2 Grupos de estudio.....	23
5.3 Criterios de inclusión	
5.3.1 Casos.....	23
5.3.2 Controles.....	24
5.4 Criterios de exclusión.....	24
5.5 Criterios de eliminación.....	24
5.6 Descripción del diseño	25
5.6.1 Recolección de la muestra.....	26
5.6.2 Almacenamiento de la muestra.....	26

5.6.3 Dilución y depleción de albúmina/IgG.....	27
5.6.4 Diafiltración y concentración de proteínas.....	28
5.6.5 Digestión por tripsina	30
5.6.6 Separación cromatográfica y detección.....	31
5.6.7 Procesamiento de datos.....	35

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS

6.1. Datos demográficos.....	37
6.2. Hallazgos ultrasonográficos.....	43
6.3. Resultados citogenéticos.....	46
6.4. Resultados proteómicos.....	52
6.4.1 Trisomía 21.....	58
6.4.2 Trisomías 13 y 18	63
6.4.3 Síndrome de Turner.....	68

CAPÍTULO VII

7. DISCUSIÓN

7.1. Diferencias del perfil proteómico de la mujeres embarazadas y no embarazadas.....	75
7.2. Cariotipo fetal en embarazos con fetos con alteraciones por ultrasonido.....	77
7.3. Perfil proteómico de las distintas aneuploidías.....	79
7.4. Diferencias entre los perfiles proteómicos y potenciales biomarcadores.....	87
7.5. Asesoramiento genético prenatal	89

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSIÓN.....	93
--------------------	----

CAPÍTULO IX

9. ANEXOS

9.1 Carta de consentimiento informado.....	96
9.2 Hoja de recolección de datos.....	98

CAPÍTULO X

10. BIBLIOGRAFÍA.....	99
-----------------------	----

ÍNDICE DE TABLAS

1. Incidencia de aneuploidías en el desarrollo humano.....	7
2. Riesgo por edad materna para aneuploidías.....	9
3. Composición de las fracciones en cada muestra	32
4. Composición de la separación analítica	33
5. Datos demográficos.....	38
6. Edad en años de las mujeres estudiadas.....	40
7. Embarazos con feto con alteraciones ultrasonográficas eliminados.....	42
8. Hallazgos ultrasonográficos en las aneuploidías.....	44
9. Concentración proteica y depleción de albúmina/IgG.....	52
10. Proteínas en mujeres con y sin embarazo.....	56
11. Proteínas sobreexpresadas en T21.....	58
12. Proteínas subexpresadas en T21.....	59
13. Proteínas únicas en T21.....	61
14. Distribución de las proteínas de embarazos con T21 según ruta biológica.....	63
15. Proteínas sobreexpresadas en trisomías 13 ó 18.....	65
16. Proteínas subexpresadas en trisomías 13 ó 18	66
17. Proteínas únicas en trisomías 13 ó 18	67
18. Proteínas sobreexpresadas en Turner.....	69
19. Proteínas subexpresadas en Turner.....	72
20. Proteínas únicas en Turner.....	73
21. Distribución de las proteínas de embarazos con T13-18 y Turner, según ruta biológica.....	74
22. Otros estudios proteómicos en aneuploidías fetales.....	86
23. Propuesta de potenciales biomarcadores.....	88

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Esquema de la estrategia general	25
2. Diagrama de conexiones del sistema nano Acquity para las separaciones cromatográficas.....	33
3. Sistema de espectrometría de masas Q-ToF premier XE.....	34
4. Cariotipo con T21.....	47
5. Cariotipo del caso 16 (hermano con T21).....	48
6. Cariotipo con T18.....	49
7. Cariotipo con T13.....	50
8. Cariotipo con Turner.....	51
9. Cromatogramas del grupo con T21, fracción 2.....	53
10. Cromatogramas del grupo de embarazadas con feto sano por ultrasonido, fracción 3.....	54
11. Cromatogramas del grupo de mujeres no embarazadas, fracción 3.....	54
12. Comparación de la fracción 3, del caso 1 con los controles.....	55
13. Perfil de expresión normalizado de 290 proteínas del grupo de embarazos con feto sano por ultrasonido.....	57
14. Perfil de expresión comparativa entre T21 y embarazo sano	57
15. Interactoma de la SERPINA1	60
16. Interactoma de la Layilina.....	64
17. Interactoma de la Matrilina 2	71

CAPÍTULO I

1. RESUMEN

Introducción. Las anomalías cromosómicas son una de las principales causas de aborto, muerte fetal y perinatal. Cerca del 90% de estas concepciones terminan en aborto espontáneo durante la primera mitad de las gestaciones. El riesgo durante el embarazo para presentar alguna de estas condiciones, se basa en el cálculo de la probabilidad de la edad materna, marcadores bioquímicos y ultrasonográficos y recientemente, por el análisis del DNA libre fetal en suero materno (DNAIf); si el riesgo es alto, se debe confirmar el diagnóstico mediante un procedimiento invasivo. Las nuevas tecnologías de laboratorio en genética, como la proteómica, pueden detectar péptidos, de origen placentario y fetal, únicos del embarazo.

Objetivo. Analizar el perfil proteómico del suero del segundo trimestre de embarazadas con feto aneuploide (trisomía 13, 18, 21 o Turner) y comparar con el de embarazos sanos, y mujeres no embarazadas, utilizando nano-cromatografía líquida de ultra rendimiento (Micromass Q-TOF Waters®) para proponer potenciales biomarcadores.

Material y métodos. Se obtuvieron 40 muestras: 12 controles sanas no embarazadas, 10 embarazadas con feto sano y 18 mujeres con feto aneuploide

(casos). La preparación de la muestra fue la siguiente: eliminación de albúmina e inmunoglobulinas, desalinización y digestión con tripsina. El proceso de análisis se realizó en nanoUPLC MS / MS. El análisis de los datos se realizó con MassLynx 4.1 y Protein Lynx Global Server 3.0, el reconocimiento de péptidos y proteínas 6+ 3.0 usando el algoritmo MASCOT y la base de datos UNIPROT-Swissprot.

Resultados. Todas las pacientes recibieron asesoramiento genético prenatal y posnatal. Hubo 9 casos con T21, 4 con Turner, 2 casos con trisomía 13 y 3 con trisomía 18. Cada grupo mostró diferentes perfiles de proteínas únicas. Algunas proteínas son compartidas entre todas las aneuploidías (homeostasis neuronal, proteínas estructurales). Se elaboraron gráficos de interactoma, para observar las relaciones que mantienen las proteínas halladas, y de esta forma establecer a cuál ruta biológica pertenecen. Las proteínas del grupo T21 participan principalmente en la vía del complemento y coagulación. En Turner, se encontraron proteínas con un rol en la adhesión celular, presentes en la matriz extracelular y otras involucradas en la formación de la piel y angiogénesis; en el grupo de las trisomías 13 y 18 predominan proteínas de control metabólico y tumorigénesis.

Discusión y conclusiones. Se identificaron diferentes perfiles proteómicos entre los grupos incluidos. Es posible distinguir entre el proteoma de una embarazada con feto sano por ultrasonido, con el de una embarazada con un feto aneuploide, además, el proteoma es distinto entre cada una de las aneuploidías revisadas. Los resultados obtenidos son comparables a otros estudios, y aunque no muestran las mismas proteínas en todos, las vías biológicas son semejantes;

estas diferencias pueden deberse a las distintas técnicas utilizadas; de hecho, hay diferencia en el tipo de proteínas encontradas en la primera etapa del estudio (T21), en donde se encontraron proteínas de mayor abundancia en el suero, mientras que para los grupos de T13, T18 y Turner, la eliminación de estas proteínas con el pre-tratamiento de la muestra, permitió tener un análisis más fino de proteínas menos concentradas, como son las citoquinas; por otro lado, es importante destacar el número de casos analizados (18), ya que en otros estudios revisan menos casos y limitado a T21 y no comparan el perfil proteómico con el de la mujer no embarazada, lo que nos permitió identificar las proteínas que se encuentran en el suero de la mujer gestante y así, discriminar cuáles son únicas de cada aneuploidía, para proponerlas como potenciales biomarcadores. En una segunda fase de esta misma línea de investigación, se podrá iniciar su validación previa a la transferencia, para la aplicación clínica de dichos biomarcadores. Estos hallazgos podrían explicar la elevada tasa de pérdidas de las gestaciones aneuploides de forma espontánea.

Así mismo, nos permite entender mejor la fisiopatología prenatal de estas condiciones, que, al ser frecuentemente letales, no se conocen más que sus manifestaciones posnatales. La intrincada relación de algunos interactomas pudiera ser orientador para el diseño de blancos terapéuticos tejido específico, por ejemplo, neuronales o inmunomoduladores, no necesariamente de uso en cada aneuploidía, si no como modelo para enfermedades multifactoriales con estos componentes, como la demencia tipo Alzheimer, cáncer, artritis reumatoide, entre otras.

Por último, es importante fomentar e incluir el estudio de la proteómica en las distintas áreas de la medicina perinatal, no sólo en el abordaje prenatal de aneuploidías, sino de otras condiciones genéticas y de entidades multifactoriales más frecuentes que comprometen la salud reproductiva de las parejas, como son: preeclampsia, diabetes gestacional, parto pretérmino, infertilidad masculina, falla ovárica prematura, entre otras condiciones que no han sido exploradas desde el punto de vista proteico y funcional, todo esto para el beneficio final del paciente y de la sociedad en general.

CAPÍTULO II

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Antecedentes

Las aneuploidías perturban el delicado equilibrio de los genes y sus productos en las células. Una célula euploide somática presenta 46 cromosomas ($2n$, donde $n=23$). Por definición, las células aneuploides tienen un número anormal de cromosomas (no siendo múltiplo exacto de 23). Debido a que cada cromosoma contiene cientos de genes, la ganancia o pérdida de un solo cromosoma interrumpe la estabilidad existente en las células y, en la mayoría de los casos, no es compatible con la vida.¹

En los humanos, las aneuploidías más comunes son trisomías, que representan aproximadamente el 0.3% de todos los nacidos vivos. Las trisomías se caracterizan por la presencia de un cromosoma adicional, lo que eleva el número total de 46 cromosomas a 47. Con pocas excepciones, las aneuploidías son letales antes de nacer. Las trisomías representan aproximadamente el 35% de los abortos espontáneos (Tabla 1).^{1,2}

Las trisomías viables están restringidas a solo unos pocos cromosomas humanos. La trisomía humana más frecuente es la del cromosoma 21 (T21). El síndrome de Down se presenta en 1 de cada 750 nacimientos.³ Según Mutchinick

et al, 1 de cada 767 recién nacidos vivos en México tiene T21.⁴ Las personas con síndrome de Down presentan signos de deterioro cognitivo junto con otros síntomas, y en muchos casos, los pacientes viven hasta la edad adulta. Las trisomías de otros autosomas tienen efectos más graves, ya que rara vez se observan en los nacidos vivos. De hecho, las únicas otras trisomías autosómicas entre los recién nacidos son las de los cromosomas 13 y 18, presentes en 1 de cada 20 mil nacimientos y 1 de cada 8 mil nacimientos, respectivamente; los bebés afectados con alguna de estas condiciones raramente sobreviven más allá de los primeros meses de vida, llegando a vivir más de un año de edad menos del 5%.^{1,5}

En las monosomías, los individuos afectados carecen de un cromosoma, reduciendo su número total de cromosomas a 45. Las células son particularmente sensibles a la pérdida de un cromosoma, porque la única monosomía humana viable involucra al cromosoma X. Las mujeres con una sola copia del cromosoma X tienen la afección conocida como síndrome de Turner. Curiosamente, la frecuencia del síndrome de Turner es significativamente menor que la de las trisomías de cromosomas sexuales, lo que sugiere que un solo cromosoma X es insuficiente para una función celular óptima. Las mujeres viables con Turner (45, X) muestran una amplia gama de síntomas, que incluyen talla baja, alteraciones craneofaciales, infertilidad, entre otras características.^{1,5}

Tabla 1

Incidencia de aneuploidías durante el desarrollo humano
(adaptada de Hassold, T. *et al* 2001). ¹

Edad gestacional (semanas)	0-----6 a 8 -----20 -----40						
	Esperma- tozoides	Ovocitos	Embriones pre- implantación	Abortos pre-clínicos	Abortos espontáneos	Óbitos	Nacidos vivos
Incidencia de aneuploidías	1-2%	~20%	~20%	?	35%	4%	0.3%
Aneuploidías más frecuentes	varias	varias	varias	?	45, X; T16; T21; T22	T13; T18; T21	T13; T18;T21 XXX;XXY;XXY

El síndrome de Down o trisomía 21 (T21) ha sido el objetivo primario en el diagnóstico prenatal, por ser la aneuploidía más común en nacidos vivos, y la causa genética más frecuente de discapacidad intelectual, sin que existan hasta hoy métodos de prevención primaria. ⁶ Sin embargo, es posible su detección prenatal, mediante algunas pruebas de tamiz y posterior confirmación con pruebas diagnósticas, siempre acompañado de un adecuado asesoramiento genético. ⁷

El diagnóstico prenatal engloba todas aquellas acciones llevadas a cabo para detectar en el feto, la presencia de un defecto congénito que, según la definición de la Organización Mundial de la Salud (OMS), incluye toda aquella anomalía del desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular, presente al nacer, aunque pueda manifestarse más tarde, externa o interna, familiar o esporádica, heredada o no, única o múltiple. ⁷

Desde los años sesenta surge la necesidad de ofrecer a la mujer embarazada una forma de identificar a los fetos con una aneuploidía, esto a través de métodos seguros, sensibles y específicos, además de hacerlo en el menor tiempo posible. Las pacientes, sus parejas y sus médicos, desean tener la posibilidad de detectar

una aneuploidía en la etapa prenatal, no sólo para confirmarla y tomar la mejor decisión documentada, ya sea de continuar con el embarazo conociendo oportunamente el diagnóstico y tomando las diligencias médicas, psicológicas y económicas necesarias para su recibimiento y manejo posnatal, o bien, para la interrupción informada y responsable del embarazo, o bien, en caso de descartar una aneuploidía en el feto, disminuir la angustia materna que genera una sospecha de una alteración encontrada por ultrasonido fetal o por un perfil de marcadores séricos maternos de riesgo para T21.⁸

Las pruebas diagnósticas disponibles actualmente se basan en la obtención de material biológico proveniente del feto, ya sea mediante una biopsia de vellosidades coriales, amniocentesis o cordocentesis; estos procedimientos representan técnicas invasivas, no exenta de riesgo de pérdida fetal, no se encuentran disponibles a toda la población y suponen un gasto alto. Debido a ello, se han desarrollado distintas estrategias de tamiz, con el objetivo de cubrir la mayor parte de la población de gestantes en riesgo de una aneuploidía fetal, y dependiendo del resultado del tamiz, se ofrece a un menor número de pacientes la prueba confirmatoria para un diagnóstico prenatal; si el índice de detección (sensibilidad) y especificidad de estas pruebas de tamiz son cercanos al estándar de oro (cariotipo), se podría proponerlo como nueva prueba de diagnóstico prenatal que permita detectar a los fetos aneuploides.⁹

El intento por diferenciar las gestaciones euploides de las aneuploides ha llevado en las últimas décadas a una mejora en el rendimiento de los marcadores utilizados para el tamiz prenatal genético, así como un aumento de las tasas de

detección, con una tasa de falsos positivos más baja. ¹⁰

Conforme la edad materna avanza, aumenta el riesgo para presentar un embarazo con T21 u otra aneuploidía (Tabla 2)⁸; este parámetro constituía la única indicación de estudio de cariotipo fetal en los años 70's, con una baja tasa de detección (30% aproximadamente). Posteriormente se fueron introduciendo al tamiz prenatal genético, ciertos marcadores ultrasonográficos y bioquímicos que aumentan significativamente su sensibilidad.

Tabla 2

Riesgo estimado para las trisomías 21, 18 y 13 (1/número que aparece en la tabla), en función de la edad materna y la edad gestacional (adaptado Nicolaides K, *Fetal Medical Foundation*, The 11–13+6 weeks scan, 2004).

Edad Materna (años)	Trisomía 21 Gestación (semanas)				Trisomía 18 Gestación (semanas)				Trisomía 13 Gestación (semanas)			
	12	16	20	40	12	16	20	40	12	16	20	40
20	1068	1200	1295	1527	2484	3590	4897	18013	7826	11042	14656	42423
25	946	1062	1147	1352	2200	3179	4336	15951	6930	9778	12978	37567
30	626	703	759	895	1456	2103	2869	10554	4585	6470	8587	24856
31	543	610	658	776	1263	1825	2490	9160	3980	5615	7453	21573
32	461	518	559	659	1072	1549	2114	7775	3378	4766	6326	18311
33	383	430	464	547	891	1287	1755	6458	2806	3959	5254	15209
34	312	350	378	446	725	1047	1429	5256	2284	3222	4277	12380
35	249	280	302	356	580	837	1142	4202	1826	2576	3419	9876
36	196	220	238	280	456	659	899	3307	1437	2027	2691	7788
37	152	171	185	218	354	512	698	2569	1116	1575	2090	6050
38	117	131	142	167	272	393	537	1974	858	1210	1606	4650
39	89	100	108	128	208	300	409	1505	654	922	1224	3544
40	68	76	82	97	157	227	310	1139	495	698	927	2683
41	51	57	62	73	118	171	233	858	373	526	698	2020
42	38	43	46	55	89	128	175	644	280	395	524	1516

Actualmente, el diagnóstico prenatal se fundamenta en un cálculo de riesgo. La edad materna es el riesgo basal, más el patrón de presentación de ciertos marcadores bioquímicos de la madre y marcadores biométricos del feto observados por ultrasonografía. En embarazos con alta sospecha diagnóstica, se sugiere una prueba invasiva con el propósito de obtener material genético fetal para un cultivo celular y posterior análisis citogenético (cariotipo), confirmando o descartando entonces la sospecha diagnóstica que informó la prueba de tamiz usada.

El tamiz genético de primer trimestre se realiza entre la semana 10 y 12 del embarazo. Se basa en el análisis de la combinación de los marcadores séricos maternos PAPP-A (proteína plasmática A asociada al embarazo), y la fracción b-libre de la gonadotrofina coriónica humana (b-hCG), así como la magnitud de la translucencia nuchal del feto en milímetros (mm) determinada por ultrasonido. Se obtiene una sensibilidad de 55-68% sin la medición de la translucencia nuchal y de un 90% con la incorporación de dicho parámetro, ambos con una tasa de falsos positivos de alrededor del 5%.

El tamiz genético de segundo trimestre (a las 16 semanas de gestación) se integra con el riesgo obtenido del análisis de la edad materna, la AFP (alfa-fetoproteína) y la b-hCG, estriol no conjugado e inhibina A en el suero materno. Se obtiene una sensibilidad de un 60% con una tasa de falsos positivos del 5%. De igual forma, debe acompañarse de un ultrasonido estructural del feto (entre las 18 a 22 semanas de gestación), el cual puede evidenciar alteraciones en la anatomía del feto que lleva a la sospecha de algún defecto asociado a alguna

aneuploidía (pliegue nucal aumentado, hueso nasal hipoplásico o ausente, hidronefrosis, foco hiperecogénico intracardiaco, ventriculomegalia, arteria subclavia derecha aberrante, entre otros).^{8, 9 y 10}

En el síndrome de Turner (monosomía del cromosoma X), la edad materna no se ha asociado como factor de riesgo. Por lo cual, no existen tablas específicas como lo hay para T21, síndrome de Edwards y otras cromosomopatías.¹¹

A partir del 2011 como investigación y desde el 2013 de forma comercial en nuestro país, se dispone de otra prueba no invasiva de diagnóstico prenatal (*NIPT, non-invasive prenatal testing*) (realmente considerada como tamiz) en la que se analizan segmentos de ácidos nucleicos (ADN) provenientes del feto y la placenta en el suero de la mujer embarazada, reportando un índice de detección para T21 de 99.9%.^{12,13} Esta prueba también puede calcular un riesgo para otras aneuploidías de autosomas (trisomías 13 y 18) y de cromosomas sexuales (síndrome de Turner, Klinefelter); en los últimos dos años, se ha añadido la búsqueda de algunos síndromes de microdelección (síndrome de Cri-du chat, Wolff-Hirschhorn, Prader-Willi, Angelman y Di-George). Esta prueba ha tenido buena aceptación entre los médicos que la solicitan a sus pacientes en riesgo de presentar alguno de los trastornos mencionados, sin perder de vista que se trata de un estudio de cribado, y que el elevado costo de la prueba que se manufactura en laboratorios del extranjero (EUA, China, España) limita su aplicación a toda la población en riesgo.

A pesar del gran impacto de los marcadores ultrasonográficos, bioquímicos y

ahora, de ADN libre fetal, en el tamiz y diagnóstico prenatal, la capacidad de diagnosticar con precisión las aneuploidías es todavía limitada; siendo necesaria la confirmación con el estudio citogenético del feto (mediante la obtención invasiva de la muestra), por lo que sería muy útil contar con una prueba no invasiva que sea más sensible, específica y con valores predictivos positivos mayores.^{14,15}

Por otra parte, es fundamental conocer el empleo de distintos recursos tecnológicos en la búsqueda de algún indicador que pudiera ser objeto de un análisis más específico del caso en particular, que lleve a un diagnóstico más temprano o menos invasivo, inclusive, permitiendo el entendimiento de la relación que guardan entre sí los distintos marcadores que se encuentren y con la patología a estudiar. Tal es el caso de la proteómica, que se encarga de mostrar detalladamente el perfil de proteínas existente en tejidos y fluidos biológicos, así como de la identificación de las diferencias en los perfiles obtenidos, comparando así condiciones patológicas con fisiológicas, de esta forma es posible emplear algunos marcadores como biomarcadores, siendo propios de una enfermedad para contribuir en su diagnóstico o como predictores de la evolución de la misma, esto es, con factor pronóstico.¹⁶

En años recientes, se ha comprobado también su utilidad en la identificación de nuevos blancos terapéuticos, así como parte de la estrategia para evaluar la eficacia terapéutica y perfiles de toxicidad frente a medicamentos en desarrollo.^{17,18}

El análisis del proteoma es una herramienta prometedora para la identificación

de biomarcadores a usar en el diagnóstico prenatal de aneuploidías. La progresión de un embarazo depende de una compleja interacción de señales intra y extracelulares, que incluyen hormonas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento e inmunomoduladores, todas estas señales requieren un preciso equilibrio a través de la gestación, en donde participan no sólo madre e hijo, sino también la placenta. En casos de alteraciones genéticas del feto, este balance se encuentra anormal y la identificación de marcadores relevantes puede emplearse para determinar un tipo específico de patología o bien, conocer su gravedad.

Puesto que en diferentes metodologías en distintas poblaciones del mundo se han obtenido diversos perfiles proteómicos en diagnóstico prenatal de T21, se sugiere emplear el término de potenciales biomarcadores, a reserva que después se pase por la etapa de validación y transferencia a la práctica clínica, y así tener la reproducibilidad deseada en el método empleado para su identificación. Una vez que se tenga esto cubierto, es posible nombrar a las proteínas encontradas de forma consistente como biomarcadores, y en otro momento, proponer un ensayo más sencillo para su búsqueda, incluyendo no sólo determinaciones cualitativas, sino también tener la posibilidad de cuantificar su presencia.¹⁶

El análisis del proteoma puede realizarse desde dos puntos de vista: mediante técnicas que muestren perfiles (o firmas) de proteínas en alguna condición en especial, y técnicas usadas para la detección diferencial de estas proteínas. En general estos análisis han recaído en el uso coordinado de electroforesis en 2 dimensiones (2DE), analizadores de imágenes, espectrometría de masas y

programas bioinformáticos para la identificación de proteínas usando bases de datos disponibles en la web o repositorios privados en el mundo.¹⁸

Actualmente, las formas de abordaje de los estudios de proteómica pueden clasificarse en dos grandes grupos: las técnicas *Top-down*, que parten de la detección de proteínas completas, como el caso de la electroforesis 2D (en dos dimensiones) asociado al análisis de imagen y la posterior detección con MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption ionization time of flight*, respectivamente), y las técnicas *Bottom-up* o *Shotgun*, en las que se detectan péptidos para luego ensamblarlos en proteínas, con la ayuda de bases de datos; además puede acoplarse al uso de la interfase nano electrospray (nanoESI), como el caso del UPLC MS/MS (*ultra performance liquid chromatograph mass spectrometry*). Esta última, combina la separación física de la cromatografía líquida con la capacidad de análisis de un espectrómetro de masas (MS); el espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando moléculas en función de su relación entre masa y carga (m/z), que permite alcanzar niveles de detección superiores a técnicas como MALDI-TOF o SELDI;^{18,19} en este segundo grupo de técnicas se encuentra el proceso de análisis empleado en este trabajo.

La cromatografía líquida puede separar metabolitos que no son volátiles y que no han sido derivatizados, por lo que le confiere gran ventaja sobre la cromatografía en fase gaseosa, y al acoplarse a la espectrometría provee un método ideal para la detección de metabolitos desconocidos.¹⁹

El equipo utilizado en este estudio es un UPLC-MS/MS que consta de una consola con cuatro partes principales, un par de bombas encargadas de administrar los solventes que pueden ser manejados para incrementar la eficiencia de separación, un inyector de muestras que consta de un plato con temperatura ajustable para viales de 2 ml, columnas de UPLC divididas en columna de trampa y análisis, ambas de fase reversa, estas columnas llevan solventes polares y no polares, en la fase de trampa, se usa una separación alcalina y en la analítica una separación ácida, y por último, un espectrómetro de masas con configuración de analizadores en tándem, en el cual, se carga la muestra hacia la interfase conocida como nano-electrospray, asistida por vacío, temperatura y voltaje, en la cual se forma un spray de gotas de pocas micras donde ocurre el fenómeno de "*explosión coulómbica*", durante el cual se desprenden los iones de interés de los solventes usados en la separación, como se ha descrito esta interfase no genera iones, solo los separa, por lo que las moléculas de interés deben ser iones de forma natural; luego los iones son guiados por una serie de lentes magnéticas para ser enfocados al primer analizador que en nuestro caso es un cuadrupolo, donde por medio de la aplicación de un valor de radiofrecuencia y voltaje se filtran las moléculas normalmente en un rango de detección definido, los iones que no entren en este rango son eliminados al sistema de vacío, posteriormente los iones son pasados a una celda de colisión para inducir su fragmentación usando argón como inductor de fragmentación y una rampa de voltajes; estos fragmentos son enfocados y concentrados en el reflectrón y lanzados al tubo de vuelo para su separación, en

este proceso es factible detectar los precursores y los iones hijos asociados a cada precursor para su registro e interpretación.¹⁹

En el campo del diagnóstico prenatal, en 1997 Liberatori *et al* identifican mediante inmunoblot (Western blot, electrotransferencia), proteínas en el líquido amniótico (LA) que se obtenía para la confirmación citogenética de alguna sospecha de aneuploidía fetal en el 2º trimestre del embarazo;²⁰ en 2005, Wang *et al* publican el perfil proteico de LA en 2º trimestre de fetos aneuploides y normales mediante MALDI-TOF y perlas magnéticas, afirmando poder tener un resultado más rápido (2 hs) frente al reporte del análisis citogenético (2 semanas), aunque se considera como cribado todavía;²¹ en 2006, Tsangaris *et al* identificó 12 proteínas hipotéticas en LA de embarazos que tenían indicación para amniocentesis por edad materna de riesgo de 16 a 18 SDG, encontrando proteínas reguladoras, enzimas e inmunoglobulinas.²²

Un año después (2007), Nagalla *et al.* realizó en muestras de suero de mujeres en el primer y segundo trimestres del embarazo, el análisis proteómico para identificar potenciales biomarcadores séricos para detectar T21, utilizando gel de electroforesis bidimensional fluorescente (2D-DIGE), y cromatografía líquida bidimensional-cromatofoco (2D-CF), con tecnología de identificación proteica multidimensional (MudPIT; LC/LC-MS-MS), e identificación del perfil de péptidos por MALDI-TOF-MS, reportando una lista de 28 proteínas potenciales.²³ Kolialexi *et al.* (2008) realizaron un estudio en 8 gestantes del segundo trimestre, con fetos con T21, y reportan 9 potenciales biomarcadores, utilizando un análisis bidimensional en gel electroforesis (2-DE) y el equipo MALDI-TOF-MS.²⁴ Kolla *et*

al (2010) analizaron 6 muestras de suero de mujeres con embarazos con feto con T21 y 6 controles sin T21, usando placas basadas en inmunoensayos multiplexados con capacidad para 90 diferentes analitos; resultando en la identificación de 7 potenciales biomarcadores.²⁵

En un estudio del 2012 (Kang *et al.*) realizado en China en un periodo de 3 años se analizaron las proteínas encontradas en el suero materno de 18 mujeres embarazadas con feto con síndrome de Down, encontrando 10 potenciales biomarcadores mediante cromatografía LC/MS-MS.²⁶

En Londres en 2012 (Heywood *et al.*) se analizó el perfil proteómico en plasma de 28 mujeres embarazadas con feto con síndrome de Down, en dos mediciones (primer y segundo trimestres del embarazo) y en un grupo de 53 mujeres con feto euploide, encontrando elevación de C3-a, péptido amiloide y transtiretina.²⁷

Ya en 2014 nuestro grupo ha descrito un método reproducible mediante UPLC/MS/MS para determinar el perfil proteómico de la mujer embarazada con feto aneuploide, analizando a la par con muestras séricas de mujeres sanas no embarazadas y embarazadas con feto euploide, y se han encontrado algunos péptidos que pudieran ser biomarcadores para la detección prenatal de T21 (plasminógeno y proteína de unión C4b).²⁸

Sullivan *et al* (2017) refiere un abordaje proteómico (SOMAscan) del suero de 165 casos con T21 comparado con sanos, siendo el hallazgo el aumento de citosinas proinflamatorias, con un consumo de proteínas del complemento; este análisis no sólo confirma el papel de la proteómica en el ámbito diagnóstico, sino

de comprensión de la fisiopatología a nivel proteico con propuestas para establecer estrategias inmunomoduladoras en T21 como blanco terapéutico del fenotipo autoinmune de algunos casos con síndrome de Down o bien, en pacientes con trastornos reumáticos.²⁹

Son pocos los reportes que además de T21 investigan en otras aneuploidías: Kolialexi *et al* en 2010 en Grecia, mediante MALDI-TOF-MS en suero materno de 10 casos de Turner en suero materno del 2º trimestre encuentran 12 proteínas con un patrón de expresión diferencial (9 elevadas, 3 disminuidas).³⁰ Narasimhan *et al* en 2013 describen el perfil proteómico de 37 proteínas en suero materno de 23 casos con trisomías (21, 18 y 13) y 85 embarazos euploides durante el segundo trimestre del embarazo mediante SELDI-TOF/MS, describen a las glicoproteínas alfa-1-antitripsina, apolipoproteína E, apolipoproteína H, y proteína transportadora de transtiretina como potenciales biomarcadores para apoyar el diagnóstico prenatal de aneuploidías autosómicas.³¹

Hsu en 2016, realiza el análisis proteómico en el líquido amniótico de 2º trimestre de 6 casos con trisomía 18 (T18), reportando 12 proteínas diferencialmente expresadas, 5 de ellas involucradas en el metabolismo de hormonas, lípidos, respuesta inmune y enfermedad cardiovascular. Cabe señalar el carácter invasivo de este protocolo (mediante amniocentesis).³²

Cada vez son mayores las evidencias de que la proteómica ofrece información valiosa que puede ser empleada para analizar el riesgo para presentar alguna aneuploidía, todos estos estudios han sido dirigidos a población de embarazadas

con fetos con T21, algunos comparan con grupos de mujeres embarazadas con fetos euploides, encontrando escasa literatura sobre biomarcadores en suero materno mediante técnicas de proteómica de uso para otras aneuploidías fetales como trisomía 13, 18 y síndrome de Turner, además que no hay reportes del proteoma del suero de las mujeres sanas no embarazadas.

Es poca la evidencia encontrada respecto a la capacidad de que estas pruebas no sólo sean cualitativas, sino que también puede definirse la sobre expresión o sub expresión de dichos potenciales biomarcadores que permitirían describir un perfil proteómico más específico para las aneuploidías autosómicas, como el T21 y otras trisomías (13 y 18), así como de síndrome de Turner, una aneuploidía de cromosomas sexuales que con frecuencia presenta datos patológicos desde etapa prenatal.

2.2 Justificación

La frecuencia de aneuploidías en la vida posnatal supone un número bajo en lo general (3 de cada 1000 nacimientos vivos); sin embargo, su presencia en la etapa prenatal es mucho mayor, siendo causa del ~60% de las pérdidas de la gestación en primer trimestre. Es bien sabido, que el riesgo de aborto espontáneo de T21 durante la gestación es del 80% de las concepciones, cerca del 90-95% para T13 y 18 y 99% para síndrome de Turner.

Por lo que, por una parte, es valioso contar con otros métodos no invasivos que permitan su diagnóstico temprano, no sólo para ofrecer un diagnóstico precoz, sino tener alternativas a otras pruebas, debido a que son pocas las pacientes que se realizan las pruebas confirmatorias que conllevan un riesgo de pérdida del embarazo por la toma de la muestra, con un método invasivo, así como conocer y develar la compleja red de los distintos componentes que participan en la fisiopatología específica de cada aneuploidía analizada en este estudio, con el fin de obtener conocimiento que permita comprender mejor estas bases patológicas y pensar en blancos pronósticos, diagnósticos y, en un futuro, terapéuticos en algunos signos y síntomas presentes en estas condiciones cromosómicas.

CAPÍTULO III

3. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis de investigación

Existen diferencias en el perfil proteómico del suero de mujeres embarazadas con fetos con diversas aneuploidías y es posible distinguirlo del proteoma de la mujer con un embarazo con feto sano.

3.2 Hipótesis nula

No existe diferencia entre el proteoma materno de embarazos con feto con aneuploidías, fetos euploides y el de mujeres no embarazadas.

CAPÍTULO IV

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Identificar potenciales biomarcadores mediante análisis proteómico del suero materno asociados a embarazos con feto aneuploide empleando el equipo “Micromass Q-TOF premier” con UPLC y una fuente de ionización nanoelectrospray (Waters Micromass, Manchester, U.K.).

4.2 Objetivos específicos

1. Identificar diferencias del perfil proteómico de la mujer embarazada y no embarazada.
2. Determinar el cariotipo fetal en líquido amniótico de las embarazadas con feto con alteraciones por ultrasonido.
3. Obtener el perfil proteómico de las mujeres con distintas aneuploidías.
4. Identificar diferencias y comparar los perfiles proteómicos para establecer los potenciales biomarcadores.
5. Ofrecer el asesoramiento genético en las mujeres embarazadas.

CAPÍTULO V

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Tipo de estudio

- Observacional
- Transversal
- Comparativo
- Casos y Controles
- Ciego

5.2 Grupos de estudio

- Un grupo de 18 embarazadas con feto con una aneuploidía.
- Un grupo de 10 embarazadas con feto sano por ultrasonido.
- Un grupo de 12 mujeres sanas no embarazadas.

5.3 Criterios de inclusión

5.3.1 Casos.

- Mujeres en el 2º trimestre del embarazo con sospecha prenatal por hallazgos ultrasonográficos, marcadores bioquímicos o prueba de DNA libre fetal de riesgo para un feto con T21 u otra aneuploidía, que lleven

control prenatal. Que aprueben su participación con su firma en el consentimiento informado.

5.3.2 Controles.

- Mujeres embarazadas con feto sano por ultrasonido, en el 2º trimestre, que lleven control prenatal médico y ultrasonográfico; que autoricen bajo consentimiento informado su participación en el estudio.
- Mujeres sanas no embarazadas. Que autoricen su participación, bajo firma de consentimiento informado.

5.4 Criterios de exclusión

- Presencia de patología placentaria.
- Mujeres con enfermedad crónica o aguda al momento del estudio.
- Evidencia ultrasonográfica de malformaciones fetales no relacionadas con aneuploidías.
- Embarazo múltiple.
- Exposición a teratógenos.

5.5 Criterios de eliminación

- Mujeres embarazadas con feto con alteraciones por ultrasonido, con cariotipo prenatal euploide o alteración cromosómica distinta a las aneuploidías estudiadas (T21, T18, T13 o síndrome de Turner).

- Muestra sanguínea insuficiente o en malas condiciones.
- Mujeres que retiren su consentimiento informado para participar en el estudio.
- La no obtención del cariotipo del feto/aborto/óbito/muerte neonatal por falta de crecimiento celular o por falta de tejido.

5.6 Descripción del diseño

Se diseñó un procedimiento de operación estándar para la recolección y procesamiento de muestras de sangre, contribuyendo a la reproducibilidad del mismo, la separación inmediata del suero de los elementos celulares; los parámetros para el almacenamiento y su pre-proceso fueron estandarizados (Figura 1).

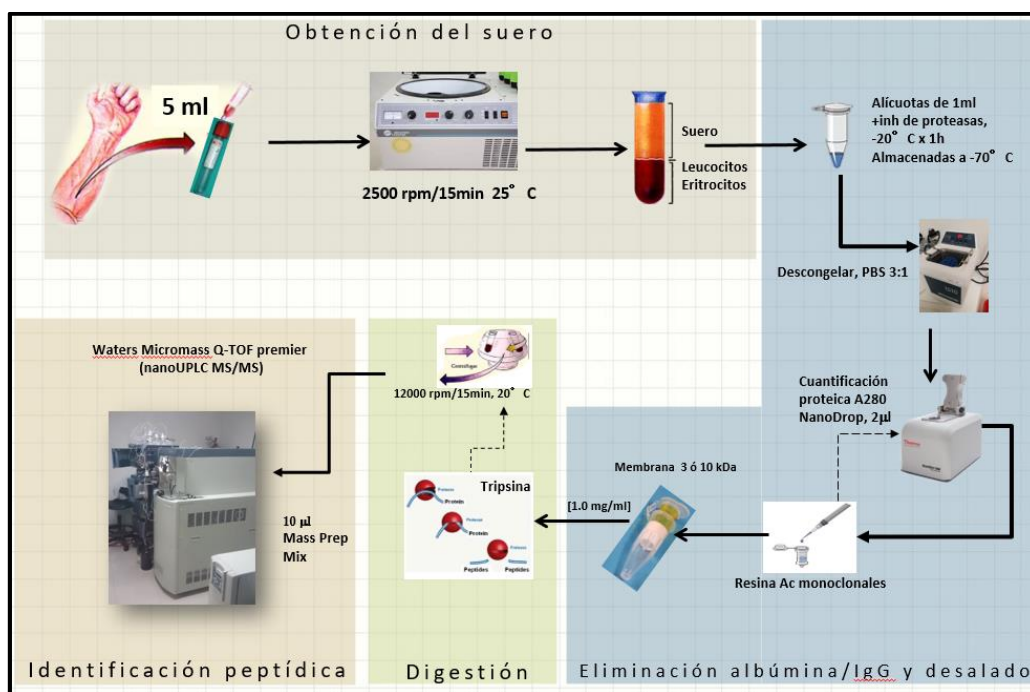


Figura 1. Esquema de la estrategia general.

5.6.1 Recolección de la muestra.

Se recibieron pacientes del servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” y del Hospital Regional Materno Infantil, que cumplieron con los criterios de inclusión, a las cuales se les ofreció una consulta de diagnóstico prenatal, se invitaron a participar en el estudio y previa firma del consentimiento informado se recolectaron 5 ml de sangre periférica de las pacientes de los grupos en tubo sin anticoagulante (tapa roja) en la sala de toma de muestras del departamento de Genética del Hospital Universitario, con un ayuno mínimo de cuatro horas, sin consumo de medicamentos y libres de cualquier enfermedad al momento de la toma.

5.6.2 Almacenamiento de la muestra.

La muestra de sangre recolectada se transportó dentro de las primeras cuatro horas posteriores a su toma al Laboratorio de Proteómica del Departamento de Genética para una centrifugación a 2500 rpm a 25°C durante 15 minutos para posteriormente extraer el suero, colocarlo en tubos Eppendorf cónicos de 2 ml y se agrega 100 µL del cóctel inhibidor de proteasas para su conservación; posteriormente se congeló durante una hora a -20°C para luego pasar a -70°C para su almacenamiento definitivo.

Equipo

- Centrifuga Beckman Coulter Allegra™ refrigerada

Material

- Jeringas de 10ml
- Tubos de ensayo desechable, sin aditivo

- Pipetas Pasteur de vidrio de 9"
- Microtubos Eppendorf cónicos de 2ml

5.6.3 Dilución y depleción de albúmina/IgG.

La muestra congelada a -70°C debe ser descongelada para posteriormente diluir 25 μl de suero con 75 μl de buffer PBS (50mM NaH_2PO_4 ; 150mM NaCl, pH 7.2), esta dilución se mezcla por vórtex y se cuantifica la concentración de proteínas de cada muestra usando el espectrofotómetro de NanoDrop^R ND-1000, de espectro completo (220-750nm) utilizando 2 μl de la mezcla. La medición se llevó a cabo usando la aplicación de análisis de proteínas a 280 nm, este método es aplicable a proteínas purificadas que presenten absorbancia a 280 nm calculando su concentración en mg/ml.

El espectrofotómetro NanoDrop^R ND-1000, mide con precisión una muestra de proteínas por arriba de 100mg/ml (albúmina sérica bovina) sin dilución. Para hacer esto, el instrumento automáticamente detecta la alta concentración y utiliza la longitud de recorrido de 0.2 mm para calcular la absorbancia.

Posterior a esta medición, se centrifugó brevemente la columna de depleción por giro del Qproteome Cell Compartment Kit (Qiagen MR®) a 500 x g, luego se estabiliza con dos alícuotas de 500 μl de PBS el cual, luego de retirar la tapa inferior, se decanta por gravedad; al terminar se coloca un tapón y se cargan 100 μl de la muestra diluida, se coloca la tapa de rosca y se mezcla vigorosamente, posteriormente se deja incubar por 10 minutos a temperatura ambiente con agitación por inversión, luego la muestra es transferida por goteo por gravedad a un nuevo tubo Eppendorf de 2 ml nuevo, acto seguido, se realizan dos lavados con 100 μl de PBS y se colecta, siendo el último con *spin* para lograr un drenaje

completo. Posterior a la colecta, se mezcla el filtrado por vórtex y se cuantifican nuevamente las proteínas totales por medio del espectrofotómetro, teniendo en cuenta que habrá una remoción aproximada del 80% del total de las proteínas, las cuales corresponden a la albúmina e inmunoglobulinas.

Equipo

- NanoDrop^R ND-1000
- Micropipeta de 0.5-10µl

Material

- Puntas 10µl
- Toallas absorbentes Kimwipes^R

Reactivos

- Agua libre de proteasas
- PBS

5.6.4 Diafiltración y concentración de proteínas.

En este proceso se acondiciona una membrana de 10 kDa o 3 kDa (Millipore, Amicon Ultra-4®) con 100 µl de bicarbonato de amonio (NH_4HCO_3) a 100mM y se centrifuga a 5,000 g por 3 minutos (en caso de ser membrana de 3 kDa, 30 minutos); posteriormente se carga la muestra en la membrana y se centrifuga a 5,000 g por 15 a 20 minutos a temperatura ambiente (en caso de ser membrana de 3 kDa 2 hs), procurando que no se seque la membrana, ya que puede fraccionarse y hacer inservible la muestra; posteriormente, se realizan dos lavados con bicarbonato de amonio 100 mM, resuspendiendo ambas veces; luego se

centrifuga por 5 minutos (para membrana de 3 kDa, 1 hs). Se recupera la muestra en 4 fracciones de 25 µl de bicarbonato de amonio 100 mM, colocándola en un nuevo tubo. Luego de homogeneizar la muestra, se realiza una lectura con el espectrofotómetro a 280 nm y se ajusta la concentración a 1.0 mg/ml.

Se utilizan preferentemente membranas de filtración de 10 kDa, ya que es útil para la detección de péptidos de 100 aminoácidos, ideales para la investigación en proteómica; dichos filtros consisten en membranas de celulosa regenerada con una unión a 10,000 Da de límite de peso molecular nominal, que es la capacidad de retención de moléculas.

Equipo

- NanoDrop^R ND-1000
- Micropipeta de 0.5-10µl
- Micropipeta de 100-1000µl
- Membranas de centrifugado de 3 y 10 kDa Millipore Amicon^R
- Centrifuga Eppendorf^R 5415C

Material

- Puntas 10µl
- Toallas absorbentes Kimwipes^R

Reactivos

- Bicarbonato de amonio 100 mM

5.6.5 Digestión por tripsina.

Se toman 100 µl de la muestra llevada a la concentración de 1mg/ml, lo que equivale a 100 µg de proteína; esta muestra es sometida a una serie de pasos para su preparación y digestión, siendo el primero una reducción, en donde se agregan 5 µl de DTT (ditiotreitól) a 200mM, se coloca en el vórtex para homogeneizar y se incuba a 65°C por 45 minutos a una hora; el siguiente paso es la derivatización, en el que se agregan 4 µl de iodoacetamida a 1M y se incuba por 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad, esta reacción debe detenerse agregando 20 µl de DTT y dejando incubar por 45 minutos a una hora a temperatura ambiente.

Una vez derivatizada la muestra, sigue su digestión, para ello se prepara la tripsina grado secuenciación, tomando 20 µl de buffer de fábrica al vial de tripsina y se resuspende por pipeteo, posteriormente se coloca a 37°C por 15 minutos en baño María, esto con la intención de activar la enzima; enseguida se agregan 5 µl de tripsina de grado secuenciación preparada (concentración de 1.0 µg/µl normalmente se utiliza en una relación 1:20 de tripsina/proteína), se vuelve a hacer vórtex a la muestra y se incuba por 24 hs a 37°C en baño María. Terminado el tiempo, se procede con centrifugación de la muestra a 12,000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente, para observar si hay precipitado (el precipitado puede provocar que las columnas y las tuberías del espectrómetro se bloqueen), por último, se agregan 10 µl del estándar Mass Prep MIX 1™ (Waters® 186002865), se homogeneiza la muestra y se colocan 100 µl de muestra en un vial de recuperación total con tapa pre- cortada.

Equipo

- Micropipeta de 0.5-10µl
- Membrana de 10kDa
- Agitador Eppendorf^R
- Centrífuga Eppendorf^R 5415C

Material

- Puntas 10µl
- Puntas 1000 µl
- Microtubos Eppendorf cónicos
- Vial de recuperación con tapa pre-cortada

Reactivos

- Ditioneitol 200mM
- Iodoacetamida 1M
- Tripsina modificada grado secuenciación
- Estándar MassPrep MIX 1
- Formiato de amonio 200mM

5.6.6 Separación cromatográfica y detección.

Todas las muestras fueron sometidas a una separación cromatográfica previo al análisis en el espectrómetro de masas mediante el equipo nanoUPLC modelo nanoAcquity, Waters, corp. Esto se realiza en un sistema de conexiones 2D-online con dilución, para la realización de separaciones en dos dimensiones. Bajo este esquema, se realizó una estrategia de fraccionamiento en seis fracciones y una

de lavado intercalada, se realizó además un blanco de acetonitrilo al 100% entre cada muestra para evitar efectos de arrastre o contaminación del sistema (Tabla 3). Cada fracción tarda 60 minutos en analizarse.

Tabla 3

Composición de acetonitrilo de las fracciones realizadas en cada muestra.

Fracción	% de Acetonitrilo
1	11.1
2	14.5
3	17.4
4	20.8
5	45
6	65

De inicio, se inyecta al equipo 1.0 µl de muestra (1.0 microgramos de proteína) en la columna de carga X-Bridge C-18, 5 micras, 300 micras x 5 cm; en esta se aplicaron seis gradientes con diferente concentración de acetonitrilo como fase B y usando formiato de amonio a 200mM como fase A, para luego pasar a una columna de trampa, en este caso fue utilizada una columna Symmetry C-18, 5 micras, 150 micras x 2 cm, y por último, una columna analítica BEH, de 1.7 micras, 75 micras x 25 cm, acondicionada a 40°C y utilizando como fase B acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico (Figura 2, condiciones de la Tabla 4).

El flujo de la columna fue dirigido hacia el espectrómetro de masas Q-Tof Premier XE TM (Waters ®) equipado con una interfase nano electrospray (Figura 3) operando bajo las siguientes condiciones:

- Voltaje de capilar (V) de 4000V
- Voltaje de cono de extracción 40.0V
- Voltaje de cono de muestra 5.0V
- Guía de iones 5.0V
- Temperatura de interfase 100°C
- Voltaje del detector MCP 1700V

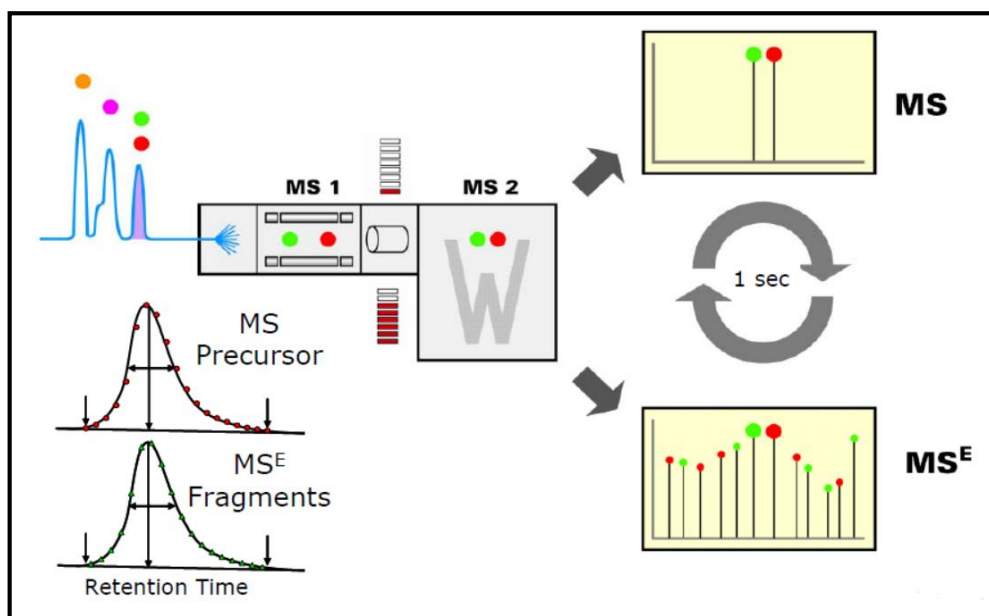


Figura 3. Diagrama del sistema de espectrometría de masas Q-Tof Premier XE TM (Waters ®).

Para el análisis de los grupos de embarazos con feto con alguna aneuploidía, se consiguió aplicar un análisis más fino del perfil proteómico, debido a que se eliminaron en mayor cantidad las proteínas altamente presentes en el suero, mejorando la preparación de la muestra en las etapas de eliminación de albúmina e inmunoglobulina G empleando anticuerpos monoclonales y verificando la cuantificación proteica luego de esta depleción, además, se sometieron a una técnica de desalado usando dos diferentes membranas hidrofílicas anisotrópicas, de 3 y de 10 k Da. Este resultado se confirma por la detección de proteínas inmunomoduladoras (interleucinas y citocinas), pues su concentración en plasma se encuentra en el rango de picogramos por mililitro (pg/mL), gracias a la alta sensibilidad de la interfase nano electrospray, mientras que la concentración las proteínas séricas albúmina, hemoglobina, transferrina, factores de coagulación y hemopexinas (hemostasia) es de miligramos por mililitro (mg/mL), siendo la capacidad de la espectrometría de masas en tándem, fundamento del método empleado en este estudio, fue de 10^{-1} hasta 10^{10} , respectivamente (rango de concentración dinámica).

5.6.7 Procesamiento de datos.

Los datos fueron adquiridos por medio del software MassLynx 4.1, Waters ® corp., con el cual también se controlaron y programaron todas las condiciones de operación, tanto del sistema de cromatografía, como de espectrometrías de masas. Todas las fracciones obtenidas de cada muestra fueron exportadas en formato RAW, para luego ser procesadas por el software ProteinLynx Global

Server 3.0 usando el algoritmo MASCOT y la base de datos Uniprot-Swissprot en formato FASTA para el proteoma humano, la cual contenía 4,350,600 proteínas o códigos.

Las proteínas reportadas fueron tomadas como positivamente identificadas cuando tenían un 95% de confiabilidad, más de 3 péptidos por proteína y cada péptido con más de 7 aminoácidos precursores.

Se realizó posteriormente un análisis de expresión de las proteínas encontradas, comparando el grupo de mujeres embarazadas con feto sano por ultrasonido y mujeres embarazadas con feto con aneuploidía, se filtraron después las proteínas en tres categorías según su expresión en: sobreexpresadas, subexpresadas y únicas en mujeres embarazadas con feto con aneuploidías. Criterio aplicado para casos: controles fue con un valor de $p=0.6$ a 1.0 , ratio: -1.5 a 1.0 , respectivamente.

Por último, se elaboró un análisis comparativo de las proteínas encontradas en estudios similares, y se analizó de acuerdo al diagnóstico citogenético, fuera trisomía 21 (T21), trisomías 13 ó 18, o síndrome de Turner.

CAPÍTULO VI

6. RESULTADOS

6.1 Datos demográficos.

En el periodo de agosto del 2014 a febrero del 2016, se reclutó una población de 10 embarazadas con feto sano por ultrasonido y 12 mujeres no embarazadas. Se recibieron en la consulta de genética a 45 embarazadas referidas por Ginecología & Obstetricia con datos ultrasonográficos sospechosos de alguna aneuploidía, se ofrece diagnóstico prenatal y se invita a participar en el estudio, hallando en 18 de estas mujeres embarazadas 18 casos con una aneuploidía: 9 casos con T21, 4 casos con síndrome de Turner, 3 de trisomía 18 y 2 con trisomía 13.

El lugar de nacimiento, hospital de procedencia, nivel socioeconómico, estado civil, ocupación, escolaridad y religión de las 40 mujeres estudiadas se muestra en la Tabla 5. La edad de las mujeres (casos y controles) se muestra en la Tabla 6.

Tabla 5

Datos demográficos de la población de estudio.

	No embarazadas N=12	Embarazadas con feto sano por USG N=10	Embarazadas con feto con T21 N=9	Embarazadas con feto con T18 N=3	Embarazadas con feto con T13 N=2	Embarazadas con feto con Turner N=4
Lugar de Origen	Nuevo León 6 Aguascalientes 1 Durango 1 Tamaulipas 1 Quintana Roo 1 Sonora 1 CDMX 1	Nuevo León 9 San Luis Potosí 1	Nuevo León 9	NL 2 Michoacán 1	Tamaulipas 1 Michoacán 1	NL 3 Oaxaca 1
Hospital de procedencia	Departamento de genética	HMI 6 HU 4	HU 5 Privada 4	HMI 2 HU 1	HU 2	HU 3 HMI 1
Nivel socioeconómico	Mayor al mínimo 9 Ingreso mínimo 3	Mayor al mínimo 7 Ingreso mínimo 1 Ninguno 2	Mayora al mínimo 8 Ingreso mínimo 1	Mayora al mínimo 2 Ingreso mínimo 1	Mayora al mínimo 1 Ingreso mínimo 1	Mayora al mínimo 1 Ingreso mínimo 1 Ningún ingreso 2
Estado Civil	Solteras 8 Casadas 4	Unión libre 4 Casadas 3 Solteras 3	Casadas 8 Unión libre 1	Soltera 1 Unión libre 2	Casada 1 Unión libre 1	Unión libre 3 Soltera 1
Ocupación	Profesionistas 6 Empleadas 3	Hogar 6 Estudiante 3 Empleada 1	Empleada 6 Hogar 3	Empleada 3	Hogar 2	Hogar 2 Estudiante 1 Comerciante 1

	Estudiantes 3					
Escolaridad	Licenciatura 7 Carrera técnica 2 Posgrado 3	Preparatoria 4 Secundaria 3 Primaria 1 Carrera técnica 1 Licenciatura 1	Licenciatura 5 Carrera técnica 2 Secundaria 1 Preparatoria 1	Analfabeta 1 Prepa 1 Técnica 1	Secundaria 1 Licenciatura 1	Primaria 1 Secundaria 2 Prepa 1
Religión	Católica 10 Cristiana 1 Ninguna 1	Católica 9 Ninguna 1	Católica 9	Católica 2 Cristiana 1	Católica 1 Cristiana 1	Católica 3 Ninguna 1

HU: Hospital Universitario, UANL.

HMI: Hospital Regional Materno Infantil, SSA, NL.

Tabla 6

Edad en años y las medianas de los casos y controles.

Controles		Casos								
Embarazadas feto sano (n=10)	No embarazadas (n=12)	T21 (n=9)	T18 (n=3)	T13 (n=2)	Turner (n=4)					
37	49	41	40	42	23					
37	39	41	35	26	22					
33	39	41	24		20					
29	32	40			18					
25	32	39								
24	29	38								
23	28	37								
20	26	35								
20	26	32								
19	25									
	25									
	24									
25	28	37	35	34	21					

Mediante la historia clínica genética completa de las pacientes se integra una sospecha diagnóstica prenatal, apoyados con el reporte ultrasonográfico de perinatología, descartando de esta manera los casos que no fueran compatibles con T21 u otra aneuploidía; en todas las pacientes se realizó cariotipo fetal, se dio asesoramiento genético y seguimiento médico en consultas subsecuentes hasta la resolución de su embarazo.

De las 45 pacientes con datos ultrasonográficos sospechosos para una aneuploidía, se eliminaron 16 por presentar un cariotipo normal (euploide) con

diagnóstico prenatal (14 amniocentesis) o posnatal (2 óbitos, muestra de tejido); de éstos, los datos ultrasonográficos aislados observados incluían translucencia nuchal aumentada (2/16), megavejiga (2/16), hernia diafragmática (2/16), y 10/16 con múltiples malformaciones, como canal aurículo-ventricular, arteria umbilical única, ausencia de hueso nasal, probable atresia esofágica, labio y paladar hendido, mielomeningocele, higroma quístico, *hydrops* fetal, agenesia de cuerpo calloso, hidronefrosis bilateral, holoprosencefalia, y marcadores menores como ventriculomegalia, intestino hiperecogénico, foco ecogénico intracardiaco. En todos estos casos se ofreció el asesoramiento genético específico para cada paciente.

Se eliminaron otros 11 casos por lo siguiente: 2/11 casos con un resultado de cariotipo diferente a una aneuploidía (uno con material adicional en 8p, otro con una poliploidía en mosaico, mos 92,XXXX[3]/46,XX[22]). En 7/11 casos no se obtuvo un resultado de cariotipo, por diferentes motivos: 2/7 fueron abortos espontáneos en los que el tejido no tuvo un crecimiento celular para un cariotipo; 3/7 casos rechazaron el procedimiento invasivo de forma prenatal y nacieron en otro hospital, quedándonos sin muestra confirmatoria; 1/7 se trató de una muerte neonatal temprana a las 30 semanas de gestación sin muestra para cultivo, 1/7 otro caso presentaba oligoamnios por lo que se ofreció cordocentesis o muestra de tejido al nacer el bebé, pero la mamá lo rechazó. Y en dos casos (2/11), aunque se reportaron aneuploidías en el cariotipo fetal (un caso con T21 y otro con síndrome de Turner), la muestra de suero de la madre fue rechazada para el proceso de proteómica por ser insuficiente (Tabla 7).

Tabla 7

Mujeres embarazadas con feto con alteraciones ultrasonográficas eliminadas del estudio.

Eliminadas (n=27)	Situación para eliminarla	
16	Cariotipo diploide	46, XX: 10 46, XY: 6
1	Cromosopatía estructural no balanceada	46, XX, add(8)(p23)
1	Mosaico de poliploidía	mos 92,XXXX[3]/46,XX[22]
7	No cariotipo fetal	<ul style="list-style-type: none"> - 2 abortos espontáneos sin tejido para estudio. - 3 rechazaron amniocentesis, nacen en otro hospital, no tejido. - 1 muerte neonatal temprana (30sdg), sin muestra. - 1 oligohidramnios: se ofrece cordocentesis, no aceptan procedimiento; fallece al nacer, no tejido.
2	Muestra de suero insuficiente para análisis proteómico	<ul style="list-style-type: none"> - 1 T21 - 1 Turner
=27		

En cada uno de los casos, incluidos o eliminados del análisis final, se ofreció el correspondiente asesoramiento genético hasta donde fue posible en la intervención durante la consulta y se brindó el seguimiento médico individualizado.

6.2 Hallazgos ultrasonográficos.

Para los casos con T21, la translucencia/pliegue nucal aumentado fue el dato más frecuente (8/9), hipoplasia de hueso nasal en 5/9; ducto venoso anormal en 2/8; regurgitación tricuspídea 2/9; en un caso se reportó anomalía de Ebstein; en algunos casos se asociaron hidronefrosis, foco intracardiaco, intestino hiperecogénico, estos últimos, clasificados como marcadores menores.

En los casos con T18, los datos ultrasonográficos fueron: alteración en eje radial (3/3), comunicación interventricular en 2/3, polihidramnios (1/3, sospecha de atresia de esófago), quistes en plexos coroides (1/3) y translucencia nucal aumentada en 1/3.

Los 2 casos con T13 presentaron cardiopatía compleja, uno de ellos además con hernia diafragmática y hendidura orofacial, el otro con arteria umbilical única.

El hallazgo de hidrops fetal con o sin higroma quístico, se presentó en los 4 casos con síndrome de Turner. Uno de ellos mostró además riñón multiquístico (ver Tabla 8).

Tabla 8

Hallazgos ultrasonográficos de los casos con aneuploidías.

Caso	Cariotipo fetal	Edad (años)	SDG	Hallazgos US
1	47,XY,+21	41	20	TN aumentada, ausencia de h. nasal
2	45, X	18	22	TN aumentada, hidrotórax, riñón multiquístico der, hidrops, higroma quístico severo y septado; hipoplasia cavidades izq. cardiacas
3	47, XX, +18	40	25	TN 6mm, hipoplasia de h. nasal, disminución de longitud radio der
4	47,XY,+21	41	16	TN 6.1mm, ausencia h. nasal, ducto vv con onda A reversa
5	47,XY,+21	32	23	Ausencia h. nasal, focos hiperecogénicos intracardiacos, intestino hiperecogénico, dilatación pielocalicial
6	47, XY, +18	24	28	Quiste plexo coroideo, cardiopatía (CIV), polihidramnios y alteración en mano no especificada
7	47, XY, +21	39	16	14 sdg: TN 5.9mm
8	47, XY, +21	40	16	TN 5mm, h nasal presente, Doppler tricuspídeo normal
9	47, XY, +18	35	29	28 sdg: ausencia radial, CIV, pbe atresia esófago-polihidramnios ILA 51, pbe craniosinostosis, edema nariz
10	45, X	20	19	13 sdg: TN >3mm, h. nasal anormal; 19 sdg: hidrops, higroma quístico, derrame pleural y ascitis
11	47, XX, +21	41	16	12 sdg: TN 4.8mm, hipoplasia hueso nasal, pbe regurgitación tricuspídea
12	47, XX,+13	42	32	30 sdg: hernia diafragmática izq. LPH bilateral, feto femenino, pbe cardiopatía compleja
13	45,X	23	19	19 sdg: higroma quístico, feto femenino
14	47, XX,+21	35	16	14 sdg: TN 8.1 mm, aumento en IP de ducto vv
15	45,X	22	16.5	16.5 sdg: PN 4mm
16	47, XY, +21	38	23	22.2 sdg: PN 9.7mm, h. nasal hipoplásico, micrognatia, hidronefrosis
17	46,XX,+13,rob(13;14)(q10;q10)	26	25	23 sdg: canal AV y arteria umbilical única
18	47, XX,+21	37	21	21 sdg: anomalía de Ebstein, PN 6 mm

US: ultrasonográficos; SDG: semanas de gestación; TN: translucencia nucal; h: hueso; vv: venoso; PN: pliegue de la nuca; CIV: comunicación interventricular; IP: índice de pulsatilidad; AV: aurículo-ventricular; pbe: probable; izq: izquierdo; der: derecho.

En cuanto al seguimiento de las pacientes hasta la resolución de la gestación, de los 9 casos con T21 sobreviven a la fecha 2 mujeres y un varón, siendo gestaciones de término, el varón con foramen oval al nacimiento, las niñas con corazón sano. Hubo 2/9 óbitos (22 y 23 SDG, varones ambos).

En 4/9 casos no fue posible retomar el contacto telefónico. De los 2 casos con T13: uno nace a las 35 SDG y permanece en UCIN, su cariotipo se realizó posnatal, fallece a los 10 días de vida, no se realizó autopsia. El otro caso terminó en muerte fetal de 24 SDG, y al ser una trisomía por translocación 13;14 se solicitó cariotipo a ambos padres, siendo normal en ambos (translocación *de novo*) con lo cual se dio el asesoramiento genético correspondiente. Uno de los 3 casos con diagnóstico de T18 fue óbito a las 30 SDG, la madre además presentó complicaciones por resistencia a la insulina, no se realizó autopsia fetal; los otros 2/3 casos se perdieron de su seguimiento en nuestra consulta, no regresando a atención obstétrica en los hospitales públicos de la ciudad (ambas referidas de la consulta del HMI, foráneas).

De los 4 casos con Turner, se documentó muerte fetal en dos pacientes, a las 22 y 24 SDG, sin autopsia. Los otros 2/4, se perdió el seguimiento (un caso de Oaxaca, otro de Cadereyta).

6.3 Resultados citogenéticos.

Las muestras para el diagnóstico prenatal mediante amniocentesis, fueron tomadas en el servicio de Perinatología del Hospital Universitario o en el Hospital Materno Infantil por los perinatólogos de sus servicios, y fueron enviadas a genética previa inclusión en el estudio, contando con muestra de sangre de la mamá para análisis proteómico.

De los casos, 14/18 se tomaron durante el segundo trimestre de la gestación (rango de 16 a 25 SDG); 2 casos acudieron de manera tardía al ultrasonido estructural, y las muestras prenatales, se tomaron a las 28 y 29 semanas (tercer trimestre). En 2/18 casos, el cariotipo se realizó de sangre periférica del recién nacido.

Para definir a los casos (embarazo con un feto con aneuploidía) se realizó cariotipo bandas GTG; en amniocitos se realizó en 16/18 casos, tomado por amniocentesis. En un caso de T21 con DNA libre fetal positivo para T21 a las 12 SDG, la madre no aceptó el procedimiento invasivo y al nacimiento se tomó muestra del neonato, corroborando la trisomía 21, regular (caso 11). En otra embarazada, el diagnóstico de las alteraciones fetales fue tardío, acudiendo a asesoramiento genético a las 32 SDG. No se realiza análisis de células fetales, y al nacer de manera prematura el bebé, se toma muestra de sangre periférica, encontrando T13 regular (caso 12). Los cariotipos fueron procesados en el laboratorio de citogenética del departamento de Genética (ver ejemplos de cada aneuploidía en los cariogramas de las Figuras 4 a 8).

En aquellos embarazos en los que el resultado fueron euploides (fetos con distintas alteraciones ultrasonográficas, con cariotipo normal), la edad

gestacional promedio en la que se realizó la amniocentesis fue de 22.5 semanas (rango 17 a 32 SDG).



Figura 4. Cariograma en líquido amniótico bandas GTG del caso 14, con trisomía 21 regular (T21); señalado con una flecha el cromosoma extra.

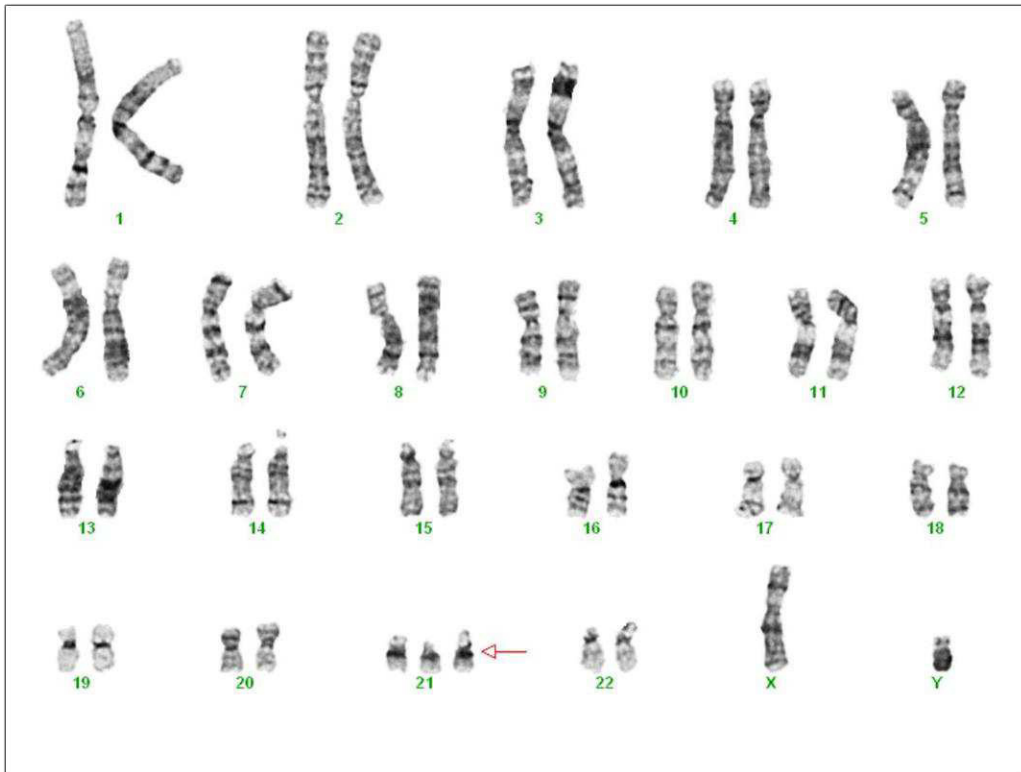


Figura 5. Cariograma en líquido amniótico bandas GTG, del caso 16, con trisomía 21 (T21) regular, con un antecedente de un hijo vivo con características clínicas de T21, pero sin cariotipo, descartando se tratase de un rearrreglo cromosómico familiar que haya favorecido la presentación de dos casos de T21 en una misma familia.

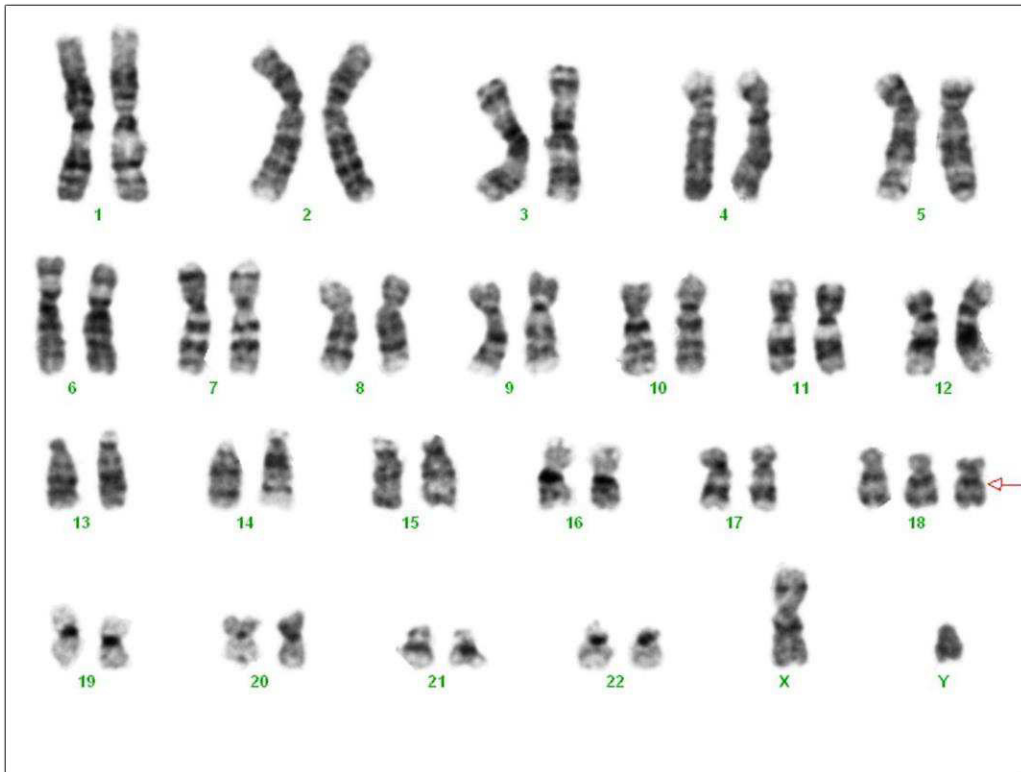


Figura 6. Cariograma en líquido amniótico bandas GTG, del caso 9, con trisomía 18 (T18) regular. Señalado con una flecha el cromosoma extra.



Figura 7. Cariograma en sangre periférica bandas GTG, del caso 12, con trisomía 13 (T13) regular. Se solicitó cariotipo en líquido amniótico pero la madre rechaza el procedimiento, y al nacer (35 SDG) se realiza toma de muestra al producto. Señalado con una flecha el cromosoma extra.

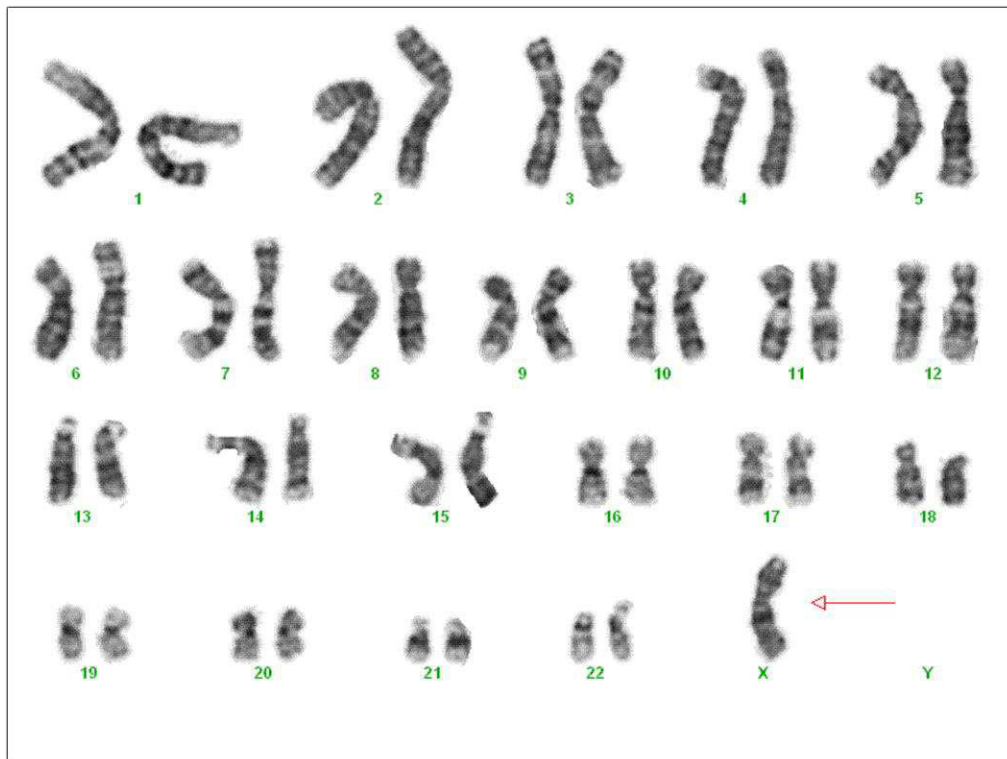


Figura 8. Cariograma en líquido amniótico, bandas GTG, del caso 10, con monosomía del X (síndrome de Turner). Señalado con una flecha la ausencia de un segundo cromosoma sexual.

6.4 Resultados proteómicos.

En 16 de las 18 mujeres embarazadas con feto aneuploide, la muestra de sangre para los estudios de proteómica fue tomada durante el segundo trimestre de gestación, con un promedio de 18.5 SDG y mediana de 21.5 SDG. En las 2 mujeres restantes, en el tercer trimestre (28 y 32 SDG).

En la preparación de las muestras se deben eliminar las proteínas más abundantes en el suero, que corresponden a la albúmina y la inmunoglobulina G (IgG), ambas representan alrededor del 85% del total, esto para poder realizar un análisis adecuado y mediciones más precisas, luego las proteínas fueron cuantificadas mediante el espectrofotómetro NanoDrop^R ND-1000 donde se comprobó la pérdida de las proteínas mayoritarias (Tabla 9).

Tabla 9

Concentración proteica y depleción de albúmina/IgG.

Muestra	Concentración inicial		Concentración luego de depleción Albúmina/IgG	
	Proteína	Porcentaje	Proteína	Porcentaje de pérdida
Embarazadas con feto con aneuploidía	14.14 mg/dl	100%	1.67 mg/dl	88.1%
Embarazadas con feto sano por US	13.45 mg/dl	100%	1.85 mg/dl	86.2%
No embarazadas	14.10 mg/dl	100%	0.958 mg/dl	93.2%

Posterior al tratamiento y análisis de la muestra se obtuvieron los cromatogramas para cada una de las muestras, las cuales presentaron características similares dentro de cada grupo (intragrupo), y diferencias entre cada uno de los tres grupos analizados (intergrupo) como se muestra en las Figuras 9, 10, 11 y 12.

Gracias a la estandarización del método, estos resultados fueron completamente reproducibles y por medio del análisis posterior de todas las fracciones de los cromatogramas en el software ProteinLynx Global Server 3.0 se establecieron las diferencias específicas entre cada uno de los grupos de estudio.

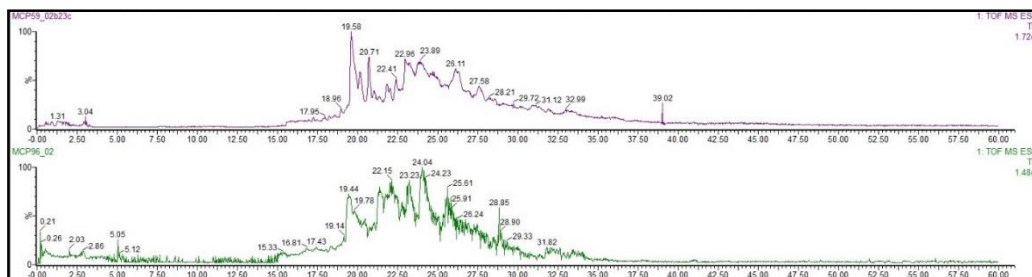


Figura 9. Comparación intragrupo de la fracción 2 de cromatogramas del grupo de mujeres embarazadas con fetos con T21 (caso 1 y 5), se observa similitud entre ambos, el inferior presenta un ruido basal mayor al superior.

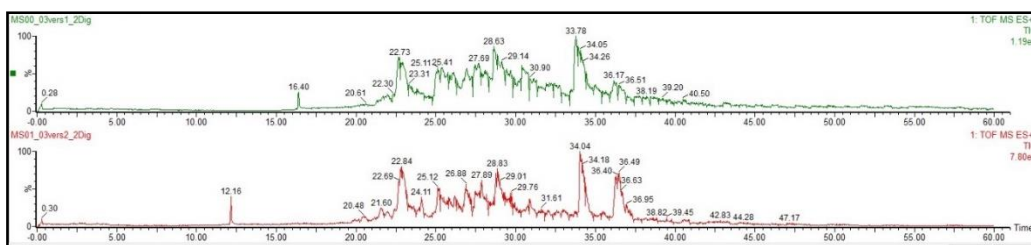


Figura 10. Comparación intragrupo de la fracción 3 de cromatogramas del grupo de mujeres embarazadas con feto sano por ultrasonido, se aprecia una similitud en la distribución de los picos, destaca la mayor intensidad del cromatograma superior.

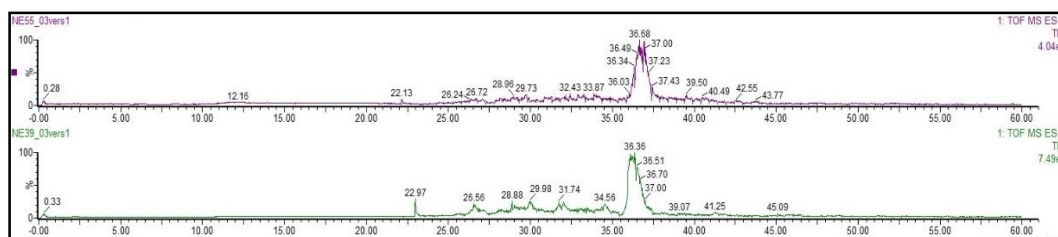


Figura 11. Comparación intragrupo de la fracción 3 de cromatogramas del grupo de mujeres no embarazadas, este grupo en particular es el que presenta mayor similitud.

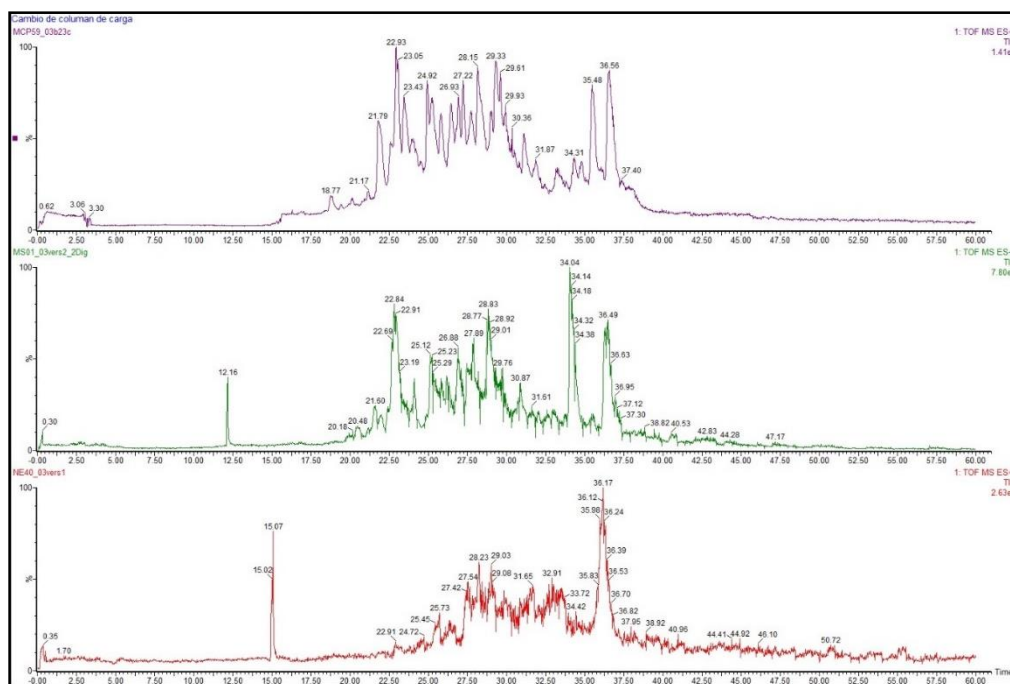


Figura 12. Comparación intergrupos de la fracción 3 de tres muestras distintas: caso 1, con T21 (panel superior), control-embarazada con feto sano por ultrasonido (panel central) y control-no embarazada (panel inferior); hay similitud entre los grupos de mujeres gestantes (superior y centro), en comparación con el cromatograma de la mujer no embarazada.

Todas las fracciones fueron exportadas al software Protein Lynx Global Server 3.0 para su análisis. La comparación con el grupo de mujeres no embarazadas se realizó para la validación del método.

El análisis cualitativo que se realizó entre los grupos control (mujeres sanas y embarazadas con feto sano por US) permite observar un incremento en la variedad de proteínas en las mujeres gestantes (Tabla 10).

Tabla 10

Proteínas encontradas en las mujeres no embarazadas y con embarazo con feto sano.

A. Mujeres no embarazadas	B. Embarazos con fetos sanos por US
1. α 1-ácida glicoproteína	1. α 1-ácida glicoproteína
2. α 1-antitripsina	2. α 1-antitripsina
3. α 2-HS glicoproteína	3. α 2-HS glicoproteína
4. α 2-macroglobulina	4. α 2-macroglobulina
5. Apolipoproteína	5. Apolipoproteína
6. Ceruloplasmina	6. Ceruloplasmina
7. Complemento	7. Complemento
8. Hemopexina	8. Hemopexina
9. Serotransferrina	9. Serotransferrina
10. Haptoglobina	10. α 1-antiquimotripsina
	11. Angiotensinógeno
	12. C4B1
	13. Hemoglobina
	14. α -1B-glicoprotein
	15. Inter- α
	16. Inter- α -tripsina
	17. Vitronectina
	18. Zinc- α 2-glicoproteína

En los casos con T21, se encontraron 3753 proteínas, 290 de ellas se presentaron también en el grupo de las mujeres con embarazo sano, por lo que se realizó un análisis de expresión, según la comparación con el grupo control (Figuras 13 y 14).

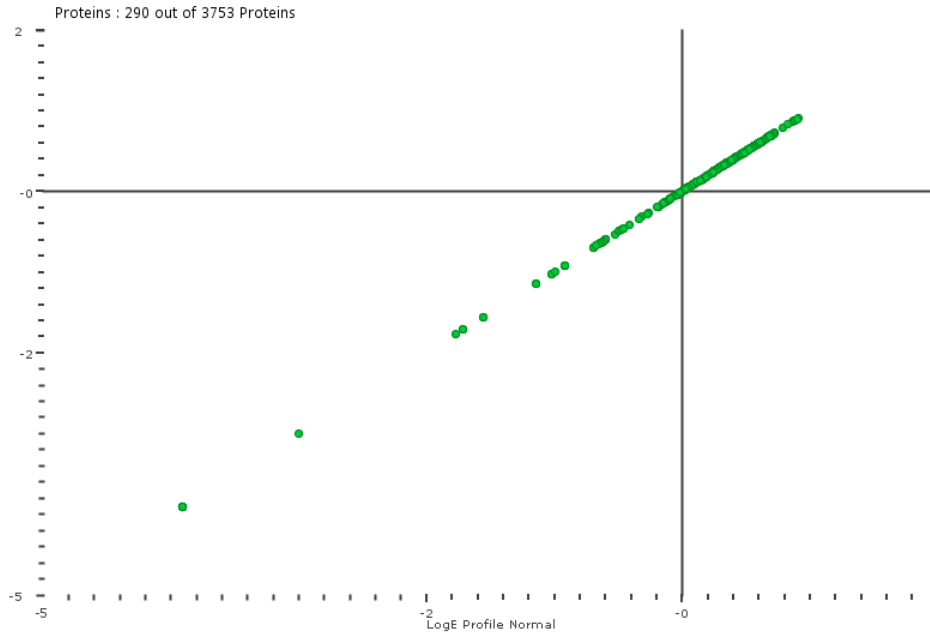


Figura 13. Perfil de expresión normalizado de 290 proteínas del grupo de mujeres con embarazos con feto sano por ultrasonido.

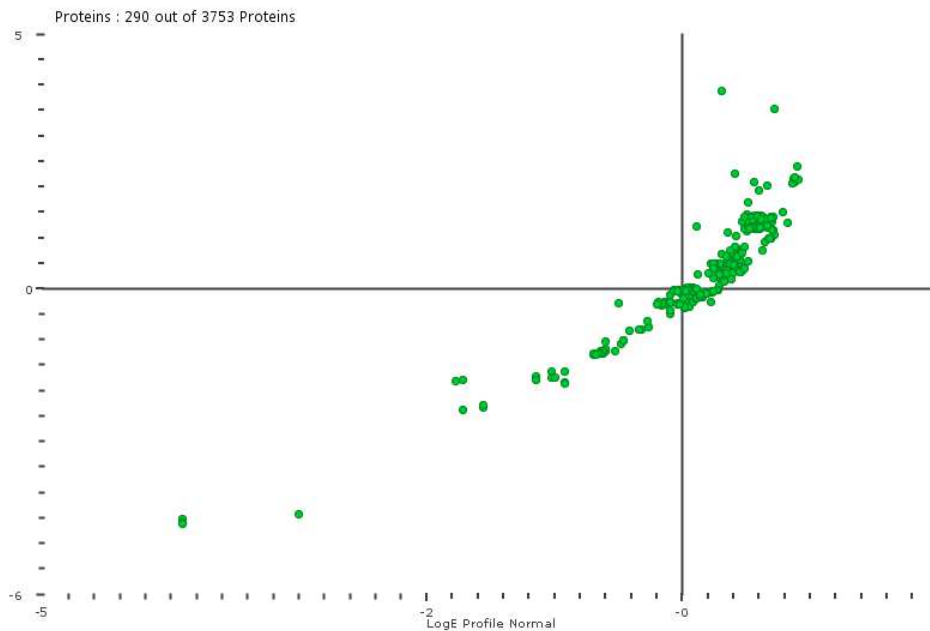


Figura 14. Perfil de expresión comparativa entre los casos con T21 y mujeres embarazadas con feto sano por US. Las proteínas del cuadrante inferior izquierdo son subexpresadas, mientras que, en el cuadrante superior derecho, se encuentran las sobreexpresadas, respecto al grupo de mujeres embarazadas con feto sano.

6.4.1 T21

Las proteínas que presentaron una expresión superior en el grupo de mujeres embarazadas con feto con T21 con respecto a las mujeres con feto sano se muestran en la Tabla 11. Las proteínas con la menor expresión en el grupo de mujeres con embarazo con feto con T21 con respecto a mujeres con feto sano (Tabla 12).

Y las proteínas únicas para el grupo de pacientes con feto con T21 (Tabla 13). Interactoma de una proteína de este grupo, Figura 15.

Tabla 11

Proteínas sobreexpresadas en embarazo con T21.

Proteína	Gen	Locus	Función molecular	Proceso biológico
Complement protein C4B frameshift mutant	<i>C4B</i>	6p21.33	Unión al complemento	Activador del complemento, respuesta inflamatoria
IgG L chain	<i>FCGRT</i>	19q13.33	Transfiere Ac IgG maternos al feto a través de placenta	Inmunidad adquirida
Angiotensinogen	<i>AGT</i>	1q42.2	Se expresa en hígado, en respuesta a la baja de tensión arterial vía renina	Regulador de presión arterial, angiogénesis, envejecimiento, señalización celular
Complement C3	<i>C3</i>	19p13.3	Unión a receptores y cofactor, unión a lípidos y proteínas	Activación del complemento, angiogénesis, coagulación. Inflamación aguda y crónica
Alpha-2-macroglobulin	<i>A2M</i>	1q42.2	Regulador negativo de la vía del complemento	Unión a proteínas

VH3 protein	<i>DUSP5</i>	10q25.2	Tirosin/serin/treonin cinasa	Proliferación y diferenciación celular
Immunoglobulin G1 Fab heavy chain variable region	<i>VHCH1</i>	14q32.33	Unión de antígenos	Fagocitosis
Ig alpha-2 chain C region	<i>IGHA2</i>	14q32.33	Unión de antígenos, migración leucocitos	Respuesta inmunológica
Apolipoprotein A-II	<i>APOA2</i>	1q23.3	Unión a receptor de apolipoproteína, unión a colesterol y transporte	Respuesta inflamatoria aguda, homeostasis de colesterol
Plasminogen	<i>PGL</i>	6q26	Activado por proteólisis y convertido a plasmina, disuelve fibrina en suero	Desarrollo embrionario, remodelamiento tisular, invasión tumoral, inflamación, ovulación

Tabla 12

Proteínas subexpresadas en embarazo con T21.

Proteína	Gen	Locus	Función molecular	Proceso biológico
Ig kappa chain C region	<i>IGKC</i>	2p11.2	Unión de antígenos	Respuesta inmunológica
Ig kappa chain V-III region SIE	<i>GKV3-20</i>	2p11.2	Unión de antígenos	Respuesta inmunológica
Serotransferrina	<i>TF</i>	3q22.1	Unión y transporte de hierro iónico	Organización de filamentos de actina, respuesta celular a ion hierro
Haptoglobina	<i>HP</i>	16q22.2	Antioxidante, unión a hemoglobina, unión a proteína	Procesos inmunes, regulador negativo de procesos catabólicos de

				peróxido de oxígeno
Alfa 1-antitripsina	<i>SERPINA1</i>	14q32.13	Inhibe elastasa, pero no tripsina. Actividad proteolítica. Protege vía respiratoria y tracto intestinal de proteasas	Unión a proteasas, complemento y coagulación
Transferrina, isoforma CRA-c	<i>TFRC</i>	3q29	Unión y transporte de hierro iónico (receptor)	Organización de filamentos de actina, respuesta celular a hierro
Ig mu cadena C region	<i>IGHM</i>	14q32.33	Presentan antígenos a células B	Respuesta inmunológica

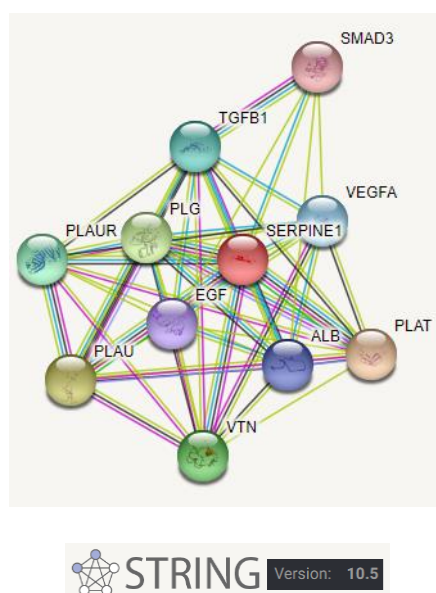


Figura 15. Interactoma de la alfa 1-antitripsina (SERPINA1). De manera directa se relaciona con el plasminógeno (PLG), el factor transformante beta-1 (TGFB1) y con vitronectina (VTN).

Tabla 13

Proteínas únicas en embarazo con feto con T21.

Proteína	Gen	Locus	Función molecular	Proceso biológico
C4b-binding protein alpha chain	<i>C4BPA</i>	1q32	Unión a RNA Poli A y a proteínas	Vía clásica del complemento
Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H1	<i>ITIH1</i>	3p21.1	Unión a calcio, endopeptidasa. Transportador de hialuronato	Células fagocíticas
Hemopexin	<i>HPX</i>	11p15.4	Transporte de Hemo a hígado	Homeostasis del hierro
Apolipoprotein E	<i>APOE</i>	19q13.32	Actividad antioxidante, unión y transporte de colesterol y lípidos,	Homeostasis lípidos. Alzheimer
Kininogen 1, isoform CRA_b	<i>KNG1</i>	3q27.3	Unión a heparina, zinc; inhibe endopeptidasa; Regulador negativo de la coagulación y proteólisis	Coagulación
Beta-2-glycoprotein I	<i>APOH</i>	17q24.2	Unión a heparina, glucoproteína y activador de lipoproteín-lipasa. Previene vía intrínseca	Coagulación
Alpha-1-acid glycoprotein	<i>ORM1</i>	9q32	Unión a proteínas de fase aguda de inflamación	Procesos inmunes: regulador negativo de TNF e IL6
Transmembrane protease serine 13	<i>TMPRSS13</i>	11q23.3	Proteólisis y endocitosis mediada por receptor	Desarrollo, infección, tumorigénesis
Kelch-like protein 12	<i>KLHL12</i>	1q32.1	Mediador de transporte entre Golgi y RE, ubiquitinización	Autoinmunidad

			proteica, involucro en vía <i>Wnt</i>	
Complement factor H	<i>CFHR1</i>	1q31.13	Unión a heparina y a heparán proteoglicanos, Activador del complemento vía alterna	Metabolismo lipídico, coagulación
Alpha-1-antichymotrypsin	<i>SERPINA3</i>	14q32.13	Involucrada en Alzheimer, Parkinson, enfermedad hepática y EPOC; participa en la conversión de angiotensina 1 a 2	Inhibidor de proteasas
Clusterin	<i>CLU</i>	8p21.1	ATPasa, unión a chaperona, unión a proteínas mal plegadas, unión a protein-ubiquitin ligasa	Morfogénesis celular, mantenimiento de mielina en SNC, activación de microglia, regulación negativa de beta amiloide, regulador negativo de respuesta a daño a DNA
Apolipoprotein C-III	<i>APOC3</i>	11q23.3	Unión a colesterol, inhibidor de actividad lipasa, unión a fosfolípidos. Componente de VLDL y HDL	Metabolismo de lípidos
Melanotransferrin	<i>MELTF</i>	3q29	Unión a hierro y proteínas en matriz extracelular, regulador positivo de plasminógeno	Homeostasis de hierro
Vitamin D-binding protein	<i>GC</i>	4q13.3	Unión a actina y vitamina D	Respuesta a estradiol, transporte de vitamina D y lactancia

Las proteínas expresadas únicamente en mujeres embarazadas con feto con T21 fueron clasificadas de acuerdo a la ruta biológica en la que participan,

encontrando que la mayoría se involucran en la coagulación y la vía del complemento, seguido de respuesta inmune (Tabla 14).

Tabla 14

Distribución de las proteínas encontradas exclusivamente en embarazos con feto con T21 según su ruta biológica.

Ruta biológica	%
Complemento y/o coagulación	33
Respuesta inmune	20
Metabolismo del grupo hemo	13
Proteínas de unión	13
Otras	6

6.4.2 Trisomías 13 y 18

En esta serie de casos se encontraron 2 con trisomía 13 y 3 casos con trisomía 18, se decidió hacer un *pool* entre la información obtenida del análisis proteómico de estas muestras para elevar la consistencia de los datos, formando el grupo de “Trisomías”. Las proteínas que presentaron una expresión superior en el grupo de mujeres embarazadas con feto con alguna trisomía con respecto a las mujeres con feto sano se muestran en la Tabla 15. Las proteínas con la menor expresión en el grupo de mujeres con embarazo con feto con Trisomía con respecto a mujeres con feto sano en la Tabla 16. Y las proteínas únicas para el grupo de

pacientes con feto con Trisomía se señalan en la Tabla 17. Ejemplo de un interactoma presente en este grupo, Figura 16.

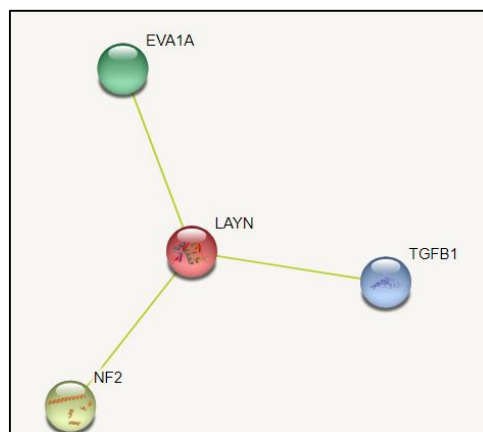


Figura 16. Interactoma de la Layilina (LAYN). Al ser una proteína de reciente descripción, hay poca información en las bases de datos proteómicos para construir virtualmente las redes de relaciones con otras proteínas. NF2, neurofibromina 2 o merlina; EVA1A, Eva-1 Homolog A, Regulator of Programmed Cell Death TGFB1, factor transformante beta-1. STRING v.10.5.

Tabla 15

Proteínas sobreexpresadas en embarazo con trisomía 13 o 18.

Proteína	Gen	Locu s	Función	Proceso biológico	Valor de expresió n
Helicase SKI2W	<i>SKIV2L</i>	6p21.3 3	Inicio de traducción, <i>splicing</i> nuclear y mitocondrial, ensamblado del ribosoma y <i>spliceosoma</i>	Señalización intracelular. Embriogénesis, espermatogénesis, crecimiento y división	5.81
Transporter 1, ATP Binding Cassette Subfamily B Member	<i>TAP1</i>	6p21.3 3	Proliferación y diferenciación de granulocitos	Inmunidad	12.30
Solute carrier family 41 member 2	<i>SLC41A2</i>	12q23.3	Transporte de Mg en membrana	Transportador (azúcares, bilis, ácidos orgánicos, metales, aminos)	8.33
Interferon gamma receptor 1	<i>IFNGR1</i>	6q23.3	Susceptibilidad a infección por <i>Helicobacter pylori</i> y micobacterias	Inmunidad	2.80
Microtubule-associated protein	<i>MAP4</i>	3p21.3 1	Dominio de unión a microtúbulos neuronales; se asocia a la proteína tau	Ensamblaje de microtúbulos	3.03

Tabla 16

Proteínas subexpresadas en embarazo con trisomía 13 o 18.

Proteína	Gen	Locus	Función molecular	Proceso biológico	Valor de expresión
Transcription factor IIIB 90 kDa subunit	<i>GTF2B</i>	1p22.2	Iniciador de transcripción por la RNA polimerasa II	Embriogénesis, crecimiento y división celular	6.36E-04
ATP synthase subunit a	<i>MT-ATP6</i>	chrMT:8,527-9,207	Transportador de protones transmembrana, síntesis de ATP, respuesta a hiperoxia	Envejecimiento	0.043
C-C chemokine receptor type 10	<i>CCR10</i>	17q21.2	Receptor de citocinas, efectores en SNC y endotelio	Desarrollo y homeostasis de inmunidad; angiogénesis	0.036
Glucagon-like peptide 2 receptor	<i>GLP2R</i>	17p13.1	Receptor acoplado al sistema de proteínas G	Señalización neuroactiva	0.188
Malate deshidrogenase, cytoplasmic	<i>MDH1</i>	2p15	Oxidación reversible de malato a oxalacetato	Metabolismo energético (ciclo de Krebs)	0.184
Ig mu chain C región	<i>IGHM</i>	14q32.33	Determina el isótopo del anticuerpo para efectuar inmunidad	Señalización celular e inmunidad	0.0174

Layilin	<i>LAYN</i>	11q23.1	Receptor de hialuronato. Encontrada elevada en cerebro en Alzheimer	Adhesión celular y movilidad	0.068
BRF1 homolog, subunit of RNA polymerase III	<i>BRF1</i>	14q32.33	Proteína de unión a TATA Box, efecto en genes para tRNA, 5S rRNA y otros microRNAs	Iniciación de transcripción por RNA polimerasa III	5.59E-04
ZC3H13 protein	<i>ZC3H13</i>	13q14.13	Procesamiento de RNA	Ciclo celular	0.177

Tabla 17

Proteínas únicas en embarazo con feto con trisomía 13 o 18.

Proteína	Gen	Locus	Función molecular	Proceso biológico
Kielina-cordina like	<i>KCP</i>	7q32.1	Potencia la proteína morfogenética ósea (BMP)	Señalización intracelular
Receptor 5 quimiocina	<i>CCR5</i>	3p21.31	Proliferación y diferenciación de granulocitos	Inmunidad
Cadherina 16	<i>CDH16</i>	16q22.1	Desarrollo de riñón, uniones mediante Ca ⁺⁺	Adhesión celular
Proteína STON1	<i>STON1</i>	2p16.3	Regulación de endocitosis, transporte por clatrin	Endocitosis
E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2	<i>MDM2</i>	12q15	Supresor tumoral	Tumorigénesis
Distrobrevina	<i>DTNA</i>	18q12.1 1	Componente del complejo distrofina, unión con Zn. Asociado con VI no	Proteína estructural

			compactado y otras cardiopatías congénitas	
Integrina beta	<i>ITGB2</i>	21q22.3	Respuesta inmune y adhesión celular	Inmunidad
Brevican	<i>BCAN</i>	1q23.1	Condroitín sulfato, promueve crecimiento y motilidad celular en tumores cerebrales	Proteína estructural
Diacilglicerol cinasa <i>eta</i>	<i>DGKH</i>	13q14.11	Fosforila diacilglicerol produciendo ácido fosfatídico; promotor de crecimiento celular (trastorno bipolar)	Señalización intracelular
IQ motif containing GTPase activating protein 2	<i>IQGAP2</i>	5q13.3	Proteína de superficie celular, regula desarrollo, activación, crecimiento y movilidad celular	Superficie celular, tumorigénesis
Proteína asociada a Keratina 19-3	<i>KRTAP19-3</i>	21q22.11	Queratinización y desarrollo embrionario	Queratinización y desarrollo embrionario
Ras GTPase-activating-like protein	<i>IQGAP2</i>	5q13.3	Unión a actina y calmodulina, citoesqueleto, supresor tumoral	Citoesqueleto

6.4.3 Turner

Las proteínas con una expresión superior en el grupo de mujeres embarazadas con feto con Turner con respecto a las mujeres con feto sano se muestran en la Tabla 18.

Las proteínas con la menor expresión en el grupo de mujeres con embarazo con feto con Turner con respecto a mujeres con feto sano en la Tabla 19. Y las proteínas únicas para el grupo de pacientes con feto con Turner se señalan en la

Tabla 20. Ejemplo de un interactoma observado en Turner, Figura 17. Ver Tabla 21 para las rutas biológicas de las proteínas halladas en T13 o 18 y en Turner.

Tabla 18

Proteínas sobreexpresadas en embarazo con feto con Turner.

Proteína	Gen	Locus	Función molecular	Proceso biológico	Valor de expresión
U3 Small Nucleolar RNA-Associated Protein 5 Homolog	<i>WDR43</i>	2p23.2	Procesamiento en nucléolo del pre-18S RNA ribosomal	Biogénesis de ribosomas. Desarrollo craneofacial células de la cresta neural	2.773
Solute carrier family 41 member 2	<i>SLC41A2</i>	12q23.3	Magnesio, glucosa, sales biliares, ácidos orgánicos, metales	Transportador	5.58
Centrosomal protein 170kDa	<i>CEP170</i>	1q43	Organización del microtúbulo	Ciclo celular	4.39
Protocadherin alpha-6	<i>PCDHA6</i>	5q31.3	Adhesión celular calcio dependiente en cerebro	Adhesión celular	10.8
Late cornified envelope 1C	<i>LCE1C</i>	1q21.3	Queratinización	Desarrollo de epidermis	3.42
Protein EMSY	<i>EMSY</i>	11q13.5	Parte del complejo metiltransferas a-H3, represor transcripcional de BRCA2	Represor transcripcional	3.22
Granulin	<i>GRN</i>	17q21.3	Regula crecimiento celular	Tumorigénesis, cicatrización, embriogénesis	2.88

Lysophosphatidic acid receptor 2	<i>LPAR2</i>	19p13.11	Movilización de calcio	Diferenciación endotelial	5.41
Hepatocyte growth factor receptor	<i>MET</i>	7q31.2	Supervivencia celular, migración celular e invasión. Embriogénesis	Supervivencia celular, migración celular e invasión. Embriogénesis	4.17
TATA box-binding protein-associated factor RNA polymerase I subunit C	<i>TAF1C</i>	16q24.1	Componente del complejo para la transcripción SL1/TIF-IB	Transcripción dependiente de RNA polimerasa I	2.74
Matrilin 2	<i>MATN2</i>	8q22.1	Redes filamentosas extracelulares en varios tejidos	Matriz extracelular	3.35
Cadherin 5	<i>CDH5</i>	16q21	Unión a calcio	Maduración vasos sanguíneos	3.66
Plexin-B2	<i>PLXNB2</i>	22q13	Receptor transmembrana que participa en el crecimiento de axones y migración celular en respuesta a semaforinas	Unión célula-célula	4.05
Histone deacetylase 5	<i>HDAC5</i>	17q21.3	Deacetilación de los residuos de lisina en la parte N-terminal de las histonas del core (H2A, H2B, H3 and H4)	Represión epigenética: progresión de ciclo celular, eventos del desarrollo, regulación transcripcional	3.56

*Nivel de confiabilidad de expresión: 0.6-1.0. Ratio -1.5 a +1. Expresión de proteína >1 significa sobre-expresión, mientras que <1 es sub-expresión.

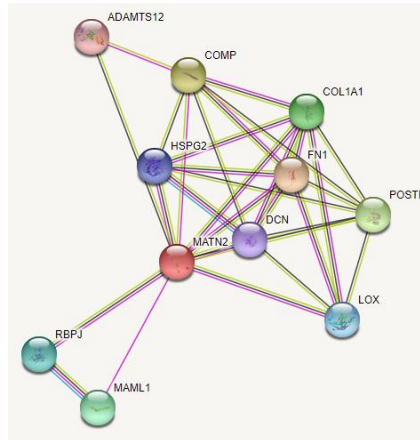


Figura 17. Interactoma de la Matrilina 2. La clave de colores de las líneas conectoras indica: fucsia, interacción determinada experimentalmente; aqua, filtrado de bases de datos; verde, predicción por genes vecinos; STRING v.10.5.

Tabla 19

Proteínas subexpresadas en embarazo con feto con Turner.

Proteína	Gen	Locus	Función molecular	Proceso biológico	Nivel de expresión
Transcription factor III B 90 kDa subunit	<i>GTF2B</i>	1p22.2	Iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa II	Factor de transcripción	9.59E-04
Complement C4	<i>C4B</i>	6p21.3	Vía clásica de la coagulación	Coagulación	0.029
C-C chemokine receptor type 10	<i>CCR10</i>	17q21.2	Desarrollo, homeostasis inmunidad en SNC, endotelio	Sistema inmune y angiogénesis	0.061
Glucagon-like peptide 2 receptor	<i>GLP2R</i>	17p13.1	Estimula el crecimiento intestinal, estímulo de vellosidades en intestino delgado	Señalización intracelular	0.166
Transcription factor 20	<i>TCF20</i>	22q13.2	Reconoce al factor de crecimiento derivado de plaquetas para el promotor de metaloproteinasa 3 de matriz extracelular	Factor de transcripción, induce migración celular	0.093
BRF1 homolog, subunit of RNA polymerase III	<i>BRF1</i>	14q32.33	TATA Box Binding Protein (TBP)	Factor de transcripción	9.98E-04
Ig mu chain C region	<i>IGHM</i>	14q32.3	Reconocimiento célula-célula. Receptor de superficie celular	Sistema inmune	0.017

Tabla 20

Proteínas únicas en embarazo con feto con Turner.

Proteína	Gen	Locus	Función	Proceso biológico
Receptor 5 quimiocina*	<i>CCR5</i>	3p21.31	Proliferación y diferenciación de granulocitos	Inmunidad
Integrina alfa	<i>ITGAE</i>	17p13.2	Junto con E-cadherina forma el Ag asociado mucosas- linfocito 1 humano, presente en linfocitos intraepiteliales del intestino	Inmunidad humoral. Inflamación y fibrosis
Grancalcina	<i>GCA</i>	2q24.2	Proteína de unión a calcio, presente en PMN y macrófagos	Inmunidad celular
Proteína asociada a microtúbulos	<i>MAP1S</i>	19p13.11	Anclaje de microtúbulos a centrosomas. Unión a DNA	Ciclo celular
Pecanex-like protein 2	<i>PCNX2</i>	1q42.2	Inestabilidad de microsatélites en colon, citoesqueleto y molécula de adhesión	Tumorigénesis
Proteína STON1	<i>STON1</i>	2p16.3	Regulación de endocitosis	Endocitosis
Proepiregulina	<i>EREG</i>	4q13.3	Ligando del receptor del factor de crecimiento epidérmico	Inflamación, cicatrización, maduración de ovocitos, proliferación celular
Puratrofina 1	<i>PLEKHG4</i>	16q22.1	Factor de intercambio de guanina en citoesqueleto y Golgi. Es modificador en Gaucher	Señalización intracelular
Tetraspanina	<i>CD151</i>	11p15.5	Proteína de superficie celular, regula desarrollo, activación, crecimiento y movilidad celular. Ojo, riñón y sistema inmune	Superficie celular
Cadherina 4	<i>CDHR4</i>	3p21.3	Desarrollo de SNC, uniones mediante Ca++	Adhesión celular

El SNV en *CCR5* g.46369445G>T se asocia con progreso acelerado a SIDA en linfocitos T humanos

Tabla 21

Distribución de las proteínas de embarazos con T13 o T18 y Turner, según la ruta biológica en la que participan (*STRAP**).

Ruta biológica	%
TRISOMÍA 13 o 18	
Procesos celulares - Energía (mitocondria)	45
Señalización celular	19
Otros (tumorigénesis)	8
Respuesta inmune	5
Desarrollo embrionario	5
TURNER	
Procesos celulares - Unión célula-célula - Estructural	55
Regulación celular	11
Localización	9
Respuesta a estímulos	7
Respuesta inmune	7

**STRAP: editor for STRuctural Alignments of Proteins*

CAPÍTULO VII

7. DISCUSIÓN

7.1 Diferencias del perfil proteómico de la mujer embarazada y no embarazada.

La proteómica es el estudio descriptivo, cuantitativo y cualitativo de proteínas en una unidad biológica. El proteoma no es solo la suma de proteínas que se derivan de la traducción del genoma, ya que las proteínas difieren significativamente en su estabilidad y recambio, están sujetas a modificaciones postraduccionales e interactúan con otras proteínas para formar complejos estructurales y funcionales. Por lo tanto, el perfil proteómico es multifacético y dinámico, tanto espacial como temporalmente, pues refleja diferentes periodos de la diferenciación y el estado celular, esto es distinto entonces en situaciones fisiológicas como de enfermedad.

La comparación del perfil proteómico del suero en mujeres embarazadas realizado en estudios previos no había sido confrontada con el de mujeres no embarazadas (Nagalla, 2007; Koster, 2009; Kolialexi 2010; Narasimhan 2013).^{23,30,31,33} En el presente trabajo se decidió incluir un grupo de mujeres no embarazadas, lo que permitió discernir proteínas que se expresan durante el embarazo, algunas de las cuales habían sido reportadas como de relevancia en otros trabajos y propuestas como potenciales biomarcadores de aneuploidías, algunas se presentaron también en la mujer no embarazada, lo cual descarta su papel como indicador de riesgo.

Primeramente, se encontraron diferencias en la cantidad de proteínas expresadas en estos grupos de mujeres, en las no embarazadas se hallaron 24 proteínas en promedio por muestra (10 presentes en las 12 mujeres sanas no embarazadas) y fueron 60 proteínas en promedio por muestra en las gestantes (18 proteínas presentes en las 10 mujeres embarazadas), esto representa un aumento del 25%. Esto refuerza el concepto de que el embarazo es un estado de hiperproducción de complejas relaciones entre factores materno-placentarios-embrionarios/fetales.

De forma cualitativa, las proteínas que se encontraron sólo en el grupo de embarazadas fueron: angiotensinógeno, C4B1, hemoglobina, α -1B-glicoproteína, inter- α , inter- α -tripsina, vitronectina y zinc- α 2-glicoproteína. Si bien casi todas estas proteínas se encuentran de forma abundante en el suero, también se han reportado en la matriz extracelular y el hueso. Están implicadas en la adhesión celular para participar en la hemostasia, regulación de la tensión arterial y malignidad tumoral.³⁴ Su presencia durante el embarazo denota un aumento en la regulación de factores séricos para la adecuada implantación embrionaria y comunicación entre el flujo sanguíneo entre la madre y el feto a través de la placenta.

Se incluyeron los tres grupos de mujeres para poder establecer las diferencias entre el proteoma de embarazo en condiciones fisiológicas y patológicas, de embarazos con feto con T21, T13, T18 y síndrome de Turner, tomando como estándar interno de referencia, al grupo de mujeres no embarazadas.

La mediana de edad en el grupo de mujeres no embarazadas fue 28 años; el grupo de mujeres embarazadas con feto sano por ultrasonido presentó una mediana para la edad de 25 años, y la mediana para el grupo de casos de mujeres con embarazo con feto con T21 fue de 37 años; en T18 la mediana fue de 35 años. Sólo estas aneuploidías se asociaron a lo reportado como factor de riesgo para no disyunción, la edad materna de 35 años o más.^{9,14}

7.2 Cariotipo fetal en embarazos con fetos con alteraciones por ultrasonido.

Si bien los datos ultrasonográficos de los casos (Tabla 8) corresponden a los datos más comúnmente reportados en las aneuploidías (translucencia nuchal aumentada, malformaciones mayores varias), de los 9 casos con T21, cinco casos también presentaban además hipoplasia de hueso nasal, y los 9, translucencia nuchal aumentada-pliegue nuchal aumentado, por lo que podemos decir que el índice de detección para nuestra muestra solamente tomando en cuenta la translucencia nuchal / pliegue nuchal es de 64%, lo que concuerda con la literatura donde se reporta un índice de detección solo con estos marcadores de 60%. De los tres casos con T18, dos presentaron una alteración reportada en el US; un caso de T18 se sospechó por la presencia de arteria umbilical única, dato frecuente en síndrome de Edwards; los dos casos con T13 presentaron una malformación cardíaca: canal aurículo-ventricular y cardiopatía congénita compleja no especificada (como ocurre en el 80% de los casos con síndrome de Patau); los defectos cardíacos más descritos en este síndrome son las comunicaciones interauriculares e interventriculares. De los 4 casos con Turner,

3 presentaron higroma quístico, siendo este el hallazgo prenatal más frecuente, que comúnmente evoluciona a hidropesía fetal.

De las 9 pacientes incluidas en el grupo de embarazadas con feto con T21, a ocho se les realizó cariotipo en líquido amniótico y en un caso se realizó cariotipo en sangre periférica de manera posnatal; todos los resultados obtenidos correspondieron a trisomía regular, como sucede hasta en el 90-95% de los casos de síndrome de Down, a este tipo de trisomía se le conoce también como regular. La trisomía regular es el resultado de una no disyunción cromosómica en la división celular, en T21 generalmente ocurre durante la meiosis I materna, cuando un óvulo que presenta una división desigual durante la meiosis I deja una de sus células hijas con dos copias del cromosoma 21, mientras que la otra permanece sin ninguna copia; posteriormente, este óvulo con dos copias, es fertilizado por un espermatozoide normal (haploide o con una copia del cromosoma 21), provocando la trisomía en el cigoto resultante.¹ Hubo un caso con recurrencia de trisomía 21 regular, esto sucede en menos del 1% de los padres; aunque no se consideran hereditarios, aún no se conoce por completo la causa de esta situación, algunos casos raros de recurrencia pueden deberse al mosaicismo gonadal en alguno de los padres. Del total de los resultados, seis fueron 47, XY,+21 correspondiente a individuos masculinos con T21 y tres fueron 47, XX,+21 correspondiente a individuos femeninos con T21. Los 3 casos con T18 fueron trisomía regular, 2 de ellos masculinos. A diferencia de lo más reportado en T21 como una no disyunción en meiosis I, en T18 se presenta con más frecuencia en meiosis II (más del 50% de los casos), este fenómeno es único de la trisomía 18;

el riesgo de recurrencia es menor al 1%.² Un caso de los 2 con T13 se presentó en forma de trisomía por translocación entre los cromosomas 13 y 14; esta translocación Robertsoniana es la más frecuentemente reportada en el humano, y a diferencia de T13 y 18, en T13 existe una mayor proporción de casos debidos a translocación (cerca del 20%),³⁵ como parte del asesoramiento genético se solicitó cariotipo en ambos padres, estableciéndose su origen de novo, con lo cual se dio un riesgo de recurrencia del 1% para futuros embarazos.

El seguimiento luego de la resolución del embarazo no fue parte de los objetivos de este trabajo, sin embargo, es importante comentar que solamente 3 niños de los 18 casos sobreviven actualmente; los 3 con T21, 2 son niñas sin alteración cardíaca, y un niño con persistencia del conducto arterioso (PCA) que no requirió cirugía. La cardiopatía congénita es la primera causa de mortalidad en T21, y está presente en más del 40% de los casos; los tipos más comunes son el canal aurículo-ventricular y la comunicación interventricular. La esperanza de vida en T21, si no está comprometida por las cardiopatías, complicaciones neoplásicas o infecciosas, se espera sea cercana a lo normal, un 40% llega a vivir 60 años.³⁶

7.3 Perfil proteómico de las distintas aneuploidías.

Las proteínas encontradas en T21 participan en la vía de coagulación y del complemento (33% de las proteínas de este grupo), como la proteína de unión a C4b (1p32), el factor H del complemento (1q31); ambas halladas durante el primer trimestre de embarazos que desarrollan preeclampsia.³⁷ Su presencia en T21 puede deberse a un desequilibrio entre su producción y remoción placentaria.

También se encontró el plasminógeno, esta proteína disuelve la fibrina de los coágulos y es un factor proteolítico en una variedad de procesos incluido el desarrollo embrionario, remodelación de tejido, invasión de tumores e inflamación, participa además en la formación de placas de beta amiloide.³⁴ Seguidas por proteínas de respuesta inmune (20% de las proteínas halladas en T21), destacan la alfa glucoproteína ácida (9q32), con función reguladora en el sistema inmune y la beta 2- glucoproteína 1 (17q24), que además participa en la angiogénesis, sus anticuerpos se relacionan con las pérdidas gestacionales del primer trimestre en enfermedades reumáticas, como el lupus eritematoso sistémico.³⁴ El 13% siguiente corresponde a proteínas del metabolismo del hierro y el grupo hem, como la melanotransferrina (3q29) y la hemopexina (11p15), involucradas en series con pérdida gestacional recurrente.³⁸ Con una frecuencia similar (13%), se encontraron proteínas de unión celular, como el kininógeno 1 (3q27), que ha sido implicado en el desarrollo de la translucencia nucal fetal, cuyo aumento representa el marcador ultrasonográfico con mayor índice de detección para T21 y las otras aneuploidías autosómicas.³⁹ Mención aparte merece la ApoE (19q13), proteína que interactúa con APP (21q21) en la formación de beta amiloide en las neuronas, hallazgo encontrado en Alzheimer.⁴⁰

En T13-18, 45% de las proteínas identificadas están implicadas en procesos celulares, la mayoría de ellos en la obtención de energía (metabolismo mitocondrial y lipídico), 19% con señalización celular, como la kielina-cordina like (7q32) que potencia a las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), la layilina (11q23) encontrada en piezas patológicas cerebrales de pacientes con

Alzheimer.³⁴ El 8% de las proteínas, participan en tumorigénesis, como el brevican (1q23) en tumores cerebrales, la MDM2 (12q15) con función supresor de tumores, la proteína Ras GTPasa-activadora *like*, que además se desempeña como un factor de movilidad celular. Un 5% de las proteínas, promueve el correcto desarrollo embrionario, como la proteína asociada a la keratina 19 (21q22) en la queratinización del producto, el iniciador de la transcripción mediante la RNA polimerasa tipo II, que además participa en la inducción del crecimiento y división celular (encontrada 0.000636 veces subexpresada respecto a los embarazos normales) y la helicasa SKI2W (6p21) con acción central en el inicio de traducción, *splicing* nuclear y mitocondrial, ensamblado del ribosoma y del *spliceosoma*.³⁴

Y en Turner, más de la mitad de las proteínas encontradas (55%) participan en procesos celulares de unión célula-célula o como parte estructural de la matriz extracelular, como la proepiregulina y la cadherina 4, la matrilina 2, protocadherina alpha-6, seguidas de participación en procesos de regulación (11% de las proteínas de Turner) como la plexina-B2, granulina y el receptor del factor de crecimiento del hepatocito; y 7%, proteínas de inmunidad, como el receptor tipo 10 de C-C quimiocina.³⁴

Con respecto a otros estudios proteómicos en aneuploidías fetales (Tabla 22), en T21 diversos biomarcadores han sido reportados, sin embargo, la mayoría de los estudios se basan en ensayos cualitativos mediante 2D-DIGE y iTRAQ, como el caso Nagalla 2007 y Kolla 2010; Kolialexi en 2008 señala con ayuda de MALDI-TOF 8 proteínas sobre expresadas en sueros de mujeres con embarazo con T21, y la clusterina dentro de las proteínas subexpresadas; en nuestro estudio, la

clusterina se encontró únicamente en los casos con síndrome de Down. La clusterina (*CLU*, 8p21.1) pertenece a una familia de proteínas extracelulares que regulan la formación y la eliminación de la proteína amiloide (*APP*, 21q21.3). Los niveles elevados de clusterina se han observado en el cerebro y el líquido cefalorraquídeo de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA) y se han sugerido su participación en la patogénesis de la enfermedad. Es frecuente que los pacientes con T21 desarrollen EA a una edad precoz.

Narasimhan, en Singapur en 2013, describe 37 proteínas únicas en 6 embarazos con T18, y propone un “perfil de trisomías”, entre las proteínas que destacan se encuentran ApoE, ApoH, TTR (transtiretina); en nuestro estudio también encontramos ApoE (apolipoproteína E, *APOE*, 19q13) pero única en casos con T21, ApoE tiene un papel importante en la homeostasis de lípidos a nivel cerebral, asociada a riesgo para EA; ApoH no se encontró en nuestro estudio, pero si otra apolipoproteína, la A2 (sobreexpresada) y a la proteínas de unión a la vitamina D (VDBP) como única. ApoA2 (*APOA2*, 1q23) también participa en el metabolismo de los lípidos, específicamente del colesterol, y VDBP (*GC*, 4q13.3) en procesos de respuesta a estradiol.

Por su parte el grupo francés de Mange *et al*, en 2008 evalúa el líquido amniótico de 9 T21, 4 T18 y 2 T13, mediante tecnología SELDI-TOF(*Surface-enhanced laser desorption/ionization*) y determina que en los casos de Edwards y Patau se encuentra una mayor cantidad de proteínas subexpresadas (28 vs 12 sobre expresadas);⁴¹ esta situación también se presentó en nuestro estudio, siendo mucho más numerosas las proteínas subexpresadas (9 *versus* 5), con un

papel en el ciclo celular (proteína ZC3H13, 13q14.13), envejecimiento (subunidad a de la ATP sintasa, *MT-ATP6*) y señalización neuroactiva (layilina, *LAYN*, 11q23). La primera de ellas destaca, además de su locus (en el cromosoma 13), por el rol de procesamiento de RNA durante el ciclo celular; en las proteínas únicas del grupo de trisomías 13 y 18 otra proteína tiene locus 13q14.11, la diacilglicerol cinasa eta (*DGKH*) promotor del ciclo celular, relacionada en estudios de trastorno bipolar; y la distrobrevina (*DTNA*, 18q12.1), proteína estructural en el complejo de la distrofina, se ha relacionado su disfunción a la génesis del ventrículo izquierdo no compactado y a otras cardiopatías congénitas graves,³⁴ condición que se ha mencionado ya como causa número uno de la mortalidad posnatal de estas aneuploidías autosómicas.

Es importante mencionar que, si bien se trató de un estudio de proteómica y no es indispensable encontrar una correlación directa con los *loci* de las proteínas encontradas con la aneuploidía revisada, sólo en este grupo se hallaron proteínas codificadas por genes localizados en estos cromosomas. La subunidad a de la ATP sintasa es una proteína codificada por el DNA mitocondrial, no hay otro reporte de estudios de proteómica en aneuploidías prenatal que haga mención de la detección de proteínas con esta índole, situación que trasciende por su participación en el envejecimiento, dato clínico presente de manera subjetiva en síndrome de Edwards, ya que al nacimiento puede ser característico el aspecto postérmino de estos bebés.

Por último, la layilina funciona como receptor de hialuronato y ha sido encontrada en cantidades elevadas en las autopsias cerebrales de EA, asociada

a un proceso de degeneración neuronal.³⁴ En 2016 en Taiwan, Hsu encuentra en líquido amniótico de 6 embarazos con T18, 12 proteínas únicas en esta condición, nuevamente mayor cantidad de proteínas subexpresadas, como la proteína de unión a vitamina D, la alfa 1-antitripsina, el factor de crecimiento similar a la insulina y la transtiretina (VDBP, A1AT, IGFBP1, TTR, respectivamente).³² La VDBP y en nuestro análisis se encontró solamente en los casos con T21; la alfa 1-antitripsina (*SERPINE1*, 14q32.13) tiene una función de proteólisis en tejido pulmonar, su deficiencia se relaciona con fibrosis pulmonar y hepática; en nuestro estudio la A1AT se encontró subexpresada en T21, más no en el grupo de trisomías 13 y 18. La IGFBP1 (*IGFBP1*, 7p12) es una proteína de expresión hepática, es importante para la migración celular y el metabolismo, también se ha encontrado con expresión placentaria y endometrial;³⁴ en nuestro estudio no se identificó en ninguna aneuploidía, tampoco la TTR.

El único reporte encontrado para el análisis del proteoma de aneuploidías de cromosomas sexuales es del 2005 (Wang-Taiwán)²¹, quien analiza en colaboración con su grupo de Chicago, el líquido amniótico de 7 embarazos con T18, 6 T21 y 1 con T13, e incluye 1 caso con síndrome de Turner, 4 con síndrome de Klinefelter (47, XXY) y una polisomía del cromosoma X (47, XXX). Mediante MALDI-ToF, propone que el análisis con este método ofrece la ventaja del tiempo frente a realizar una prueba citogenética, sin embargo, además de que la identificación de los probables biomarcadores se realizó de forma invasiva (muestra de líquido amniótico), no explican de qué manera hubo la validación de

los mismos para realmente poder proponerlos con una utilidad clínica, y menos, con valor diagnóstico.

Otro estudio que revisa síndrome de Turner es de la Dra. Kolialexi, quien junto con su grupo pionero en Grecia de proteómica en prenatal, determina en suero materno de 10 embarazadas en 2º trimestre con síndrome de Turner 12 proteínas únicas, 9 sobreexpresadas y 3 subexpresadas.^{24, 30} Es interesante ver la descripción que realizan de las rutas biológicas para estas proteínas, ya que son similares a las encontradas en nuestro estudio, principalmente aquellas que participan en procesos celulares (55% de las proteínas halladas en Turner presentaron esta función), ya sea estructurales o de unión célula-célula, como la cadherina 4 (*CDHR4*, 3p21.3) que permite la adhesión celular necesaria para el desarrollo del sistema nervioso central a través de uniones mediante calcio; la matrilinea 2 (*MATN2*, 8q22) que forma redes filamentosas extracelulares en varios tejidos, fue hallada 3.35 veces más expresada en Turner que en el suero de mujeres con embarazo sano (Tabla 17). También se encontraron sobreexpresadas algunas proteínas importantes para la formación de la piel durante la embriogénesis y el proceso de cicatrización, como la granulina (*GRN*, 17q21), y la proepiregulina (*EREG*, 4q13) como proteína única.³⁴ Estas y otras proteínas encontradas en Turner, pueden explicar en parte la fisiopatología de la característica frecuente del *hidrops* fetal reportado en la monosomía del cromosoma X, si bien otra de las teorías de su formación es una displasia linfática, parte importante de su clínica se evidencia en dermis y epidermis.⁴²

Tabla 22

Comparación del presente estudio con otros análisis proteómicos de aneuploidías fetales.

Autor	Población	Método	P. únicas	P. SobreExpresión	P. SubExpresión
Nagalla, 2007.	56 T21 y 56 controles, suero	2D-DIGE	13	Análisis cualitativo	
Kolialexi, 2008.	8 T21 y 12 controles, plasma, 2oT	MALDI-TOF	4	8	Clusterina
Koster, 2009.	14 T21 y 15 controles, suero, <u>1erT</u>	Inmunoensayo	7 potenciales BM, comparan ID dúo test (56.2%) vs 82.5% todo junto		
Kolla, 2010.	6 T21 y 6 controles, suero, <u>1erT</u>	iTRAQ	8	Análisis cualitativo	
Narasimhan, 2013.	6 T18 y 6 controles, suero, 2oT	2D-DIGE MALDI-TOF/MS	37 únicas	Perfil de "trisomías" ApoE, ApoH, TTR	
Wang, 2005.	7 con T18 y 1 con T13, 1 Turner, 6 T21, 4 XXY, 1 XXX, LA	MALDI-TOF	"Mezcla" de proteínas puede dar el diagnóstico en poco tiempo (2hs), comparado con cariotipo		
Mange, 2008.	9 T21, 4 T18 y 2 T13, LA, 2oT	SELDI-TOF	40	12	28
Kolialexi, 2010.	10 Turner, 10 sanos, suero, 2oT	2D-E, MALDI-TOF-MS	12	9	3 (modificación postraducciona en el plasma materno)
Hsu, 2016.	6 T18 y 6 controles, LA, 2oT	2D-DIGE MALDI-TOF-MS	12; 5 diferentes	ApoA1	VDBP, A1AT, IGFBP1, TTR

2D-DIGE: Difference gel electrophoresis. MALDI-TOF: Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight. iTRAQ: Isobaric tags for relative and absolute quantitation. SELDI-TOF: Surface-enhanced laser desorption/ionization. *nanoUPLC MS/MS*: Nano ultra performance liquid chromatographic system coupled with tandem mass spectrometry. 1erT: primer trimestre. 2oT: Segundo trimestre. ApoE: apolipoproteína E. ApoH: apolipoproteína H. TTR: transtiretina. VDBP: proteína de unión a la vitamina D.

7.4 Diferencias entre los perfiles proteómicos y potenciales biomarcadores.

Las proteínas propuestas como potenciales biomarcadores en T21 son: melanotrasferrina, hemopexina, beta 2-glicoproteína 1, alfa glicoproteína ácida, kininógeno 1, la ApoE (únicas); proteína de unión a C4b, plasminógeno y ApoA2 (sobrexpresadas), y Ig kappa chain V-III region SIE y SERPINA1 (subexpresadas). En T13-18, se proponen como potenciales biomarcadores: E3 ubiquitin-proteinligasa, brevicina, Ras GTPasa, distrobrevina, kielina, diacilglicerol cinasa (únicas); la helicasa SKI2W (sobrexpresada), y a las proteínas ZC3H13, subunidad a de la ATP sintasa y layilina (subexpresadas). Y en Turner, proepiregulina, cadherina 4, MAP1S (únicas), la matrilina 2, protocadherina alpha-6, plexina-B2, granulina y el receptor del factor de crecimiento del hepatocito (sobrexpresadas), así como el receptor tipo 10 de C-C quimiocina (subexpresada).

Tabla 23

Propuesta de potenciales biomarcadores por aneuploidía.

Ruta biológica	T21	T13 y T18	Turner
Metabolismo Hemo	-Melanotransferrina U -Hemopexina U		
Coagulación y complemento (angiogenesis*)	-Proteína de unión a C4b S - Plasminógeno S -β 2 glicoproteína 1* U - SERPINA1 D		-C-C chemokine receptor type 10* D
Respuesta inmune *Inflamación/cicatrización	-Alfa glicoproteína ácida U - Ig kappa chain V-III region SIE D		-C-C chemokine receptor type 10 D -Proepiregulina * U
Tumorigénesis		-E3 ubiquitin-protein ligase U -Brevican U -Ras GTPase U	
Proteínas de unión y estructurales	- Kininógeno 1 U	-Distrobrevina (18q12) U	-Matrilina 2 S -Protocadherina alpha-6 S -Plexina-B2 S -Cadherina 4 U
Señalización intracelular		-Diacylglycerol cinasa (13q14) U -Kielina U -Helicasa SKI2W S	
Ciclo celular		-ZC3H13 proteína (13q14) D -Helicasa SKI2W S -MAP4 S	-Granulina S -MAP1S U
Embriogénesis		Helicasa SKI2W S	-Granulina S -Hepatocyte growth factor receptor S
Homeostasis neuronal	- ApoE U - Apolipoproteína A-II S	-Layilina D	-Plexina-B2 S
Envejecimiento		-MT-ATP6 D	
Número de proteínas	11	10	9

U: proteína única. S: proteína sobreexpresada. D: proteína subexpresada.

7.5 Asesoramiento genético prenatal.

A la fecha, las estrategias para el diagnóstico prenatal se han dirigido al cálculo de riesgo para las embarazadas, según su edad y en marcadores bioquímicos y de imagen por ultrasonido. Este campo ha avanzado en los últimos años a pasos agigantados, como la reciente incorporación del DNAIf, capaz incluso de detectar microdeleciones; sin embargo actualmente, al menos en nuestro medio, estas técnicas de detección no están disponibles para toda la población blanco, esto se comprueba en este estudio, donde solamente una paciente de todas las captadas presentó una prueba de DNAIf como tamiz prenatal y ninguna presentó marcadores bioquímicos; confiar solamente en la edad materna y marcadores ecográficos representa la pérdida del 40% de los casos positivos, esto sumado a la falta de capacitación y sensibilización del médico de primer contacto nubla el panorama, por eso se propone la búsqueda de potenciales biomarcadores proteómicos que orienten a la detección de T21 y otras aneuploidías por medio de obtención de proteínas del suero materno y observar su presencia y expresión en condiciones patológicas para distinguirlas de aquellas en gestación fisiológica. En un futuro tener la tercera fase de un estudio de proteómica, llamada de transferencia; por lo pronto podemos aspirar a la obtención de proteínas relacionadas que puedan ser propuestos como potenciales biomarcadores en la identificación de este tipo de padecimientos.⁴³⁻⁴⁵

En el grupo de mujeres embarazadas con feto con T21, se vieron tres casos particulares: el primero de ellos corresponde a una mujer con antecedente de 4 gestas, de las cuales la primera ocurre a los 18 años y presenta T21, la segunda

termina en aborto espontáneo, la tercera culmina en el nacimiento de un femenino sano, y la última, a los 38 años de edad, con sospecha ultrasonográfica de T21, razón por lo que se incluyó en el protocolo de estudio; en este caso se tomó en cuenta la edad de riesgo de la paciente así como los hallazgos ultrasonográficos del producto, sin embargo, llama la atención el antecedente de la pérdida gestacional previa y el primer producto con T21 (a una edad no considerada de riesgo) lo que eleva la sospecha clínica de la existencia de algún rearrreglo cromosómico que involucrara al cromosoma 21; se ingresó al protocolo y se solicitó a la madre el resultado citogenético del hijo afectado, al cabo de 15 días regresa para su cita de asesoramiento donde muestra un resultado de cariotipo del hijo anterior con fórmula cromosómica 47,XY+21, que corresponde a un individuo masculino con trisomía 21 regular, de la misma manera se entrega el resultado de cariotipo en líquido amniótico de la gesta actual (Figura 5) con el mismo complemento cromosómico, por lo que se descarta la posibilidad de un rearrreglo hereditario, se otorga asesoramiento y se menciona como factor de riesgo importante en este embarazo la edad materna avanzada. El segundo caso corresponde a una embarazada con un tamiz con DNAfl positivo para T21; luego de la consulta prenatal en genética, invitación e inclusión en nuestro estudio, la paciente rechaza realizarse cariotipo en líquido amniótico, decidiendo esperar al nacimiento; este caso pone de manifiesto la importancia del correcto asesoramiento genético, no directivo, en donde el paciente decide de manera informada qué acción tomará. El tercer caso es de una embarazada enviada de perinatología por presentar aumento de pliegue nuchal y anomalía de Ebstein fetal; como se vio anteriormente la translucencia nuchal / pliegue nuchal fue la causa más común de envío a valoración presente en la totalidad de los

casos (Tabla 19); este fue el único de T21 con una malformación mayor y aunque las cardiopatías congénitas son frecuentes en T21 (40-60%), la anomalía de Ebstein es extremadamente rara.⁴⁶ Se mencionan aparte estos casos como ejemplo de la variabilidad que puede presentarse entre pacientes con un diagnóstico similar, ya que cada uno cuenta con historiales médicos y familiares propios; es decir, aunque dos pacientes tengan síndrome de Down, no serán iguales en toda su clínica, volviendo importante la premisa de que cada paciente es único y como tal debe individualizarse la atención en cada uno.

A partir de la información obtenida en este estudio, la posibilidad de nuevas líneas de investigación es impresionante, desde la implicación de la vía del complemento y factores de coagulación en los abortos espontáneos humanos, el establecimiento de biomarcadores de riesgo para el desarrollo de demencia temprana en pacientes con T21 o con Alzheimer, el papel de las moléculas de inflamación y metabolismo lipídico para el desarrollo de preeclampsia.⁴⁷⁻⁴⁹ También permite continuar con la línea de investigación de diagnóstico prenatal y en un futuro servir de base para el desarrollo de técnicas de diagnóstico prenatal que permitan conocer más a detalle las interacciones de todas estas sustancias a nivel proteico y proponer un ensayo con utilidad clínica, para la población en riesgo de nuestro medio, que sean más fáciles de realizar en el laboratorio y como parte de un tamizaje más preciso de embarazadas de alto riesgo, como el estudio de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), una técnica de inmunoensayo en la cual un antígeno inmovilizado se detecta por medio de un anticuerpo enlazado a una enzima capaz de generar un producto detectable por medio de una señal luminosa detectada por

espectrometría, o bien, el uso de nanopartículas (poseen un tamaño comprendido entre el de pequeñas proteínas y los virus) como en el campo de la inmunoproteómica, con el empleo de aptámeros acoplados a metales, como el oro o sílice. Los aptámeros son oligonucleótidos de cadena sencilla con tamaños entre 70 y 100 nucleótidos, y son capaces de reconocer de forma específica y con alta afinidad a varios tipos de moléculas diana mediante un plegamiento tridimensional de su secuencia.⁵⁰

CAPÍTULO VIII

8. CONCLUSIÓN

El desarrollo, progresión y culminación de un embarazo depende de múltiples eventos feto-maternos complejos, que implican interacciones de factores intracelulares y extracelulares, como hormonas, moléculas de adhesión, moléculas de crecimiento e inmunomoduladores. Los procesos fisiológicos maternos y la respuesta inmune, se modifican para permitir que el feto semialogénico sobreviva en el entorno uterino. Los tejidos fetales, por otro lado, se comparan más a órganos endócrinos, pues producen una amplia gama de proteínas que entran en la circulación materna, y tienen diversos efectos en todos los sistemas del binomio. El correcto equilibrio de estas sustancias durante el embarazo, es necesario para su adecuado desarrollo, la pérdida del mismo puede deberse a alguna enfermedad gestacional o a anomalías genéticas fetales.

Es probable que la identificación de proteínas específicas del embarazo contribuya a la comprensión de la fisiopatología subyacente y al descubrimiento de biomarcadores relevantes para las aneuploidías fetales y las complicaciones del embarazo. Si se detectan en el embarazo temprano o antes del desarrollo de síntomas clínicos, pueden usarse como biomarcadores de enfermedad, mientras que los detectados en etapas posteriores probablemente sean más específicos y

estén estrechamente relacionados con el fenotipo de la enfermedad. Los biomarcadores también pueden mejorar el manejo del embarazo, determinar el resultado y permitir planificar posibles complicaciones en el parto.

En este estudio se identificaron los perfiles proteómicos de embarazos con feto sano por ultrasonido, embarazos con aneuploidías y de mujeres sanas no embarazadas; se observó un aumento considerable en la expresión proteica en suero durante el embarazo, y es posible distinguir entre el proteoma de una embarazada con feto sano por ultrasonido (presumiblemente euploide), con el de una embarazada con un feto aneuploide, y aún más, distinto entre cada una de las aneuploidías revisadas.

El avance gracias a mejores métodos de laboratorio y herramientas paraclínicas para la detección del riesgo elevado de presentar productos con aneuploidías, en la mujer embarazada, es significativo, sin embargo, todavía es necesario instruir y capacitar mejor al personal de salud en la identificación de factores de riesgo en el primer nivel de atención y su referencia a un segundo nivel para la detección de marcadores ecográficos como primer paso en la sospecha de estas condiciones, así como educación poblacional para que la mujer acuda desde las primeras semanas del embarazo para comenzar su control prenatal.

Por último, es importante fomentar el crecimiento de los estudios de proteómica en el área de diagnóstico perinatal, ya que como se mencionó anteriormente, da la oportunidad de la estandarización de nuevas técnicas precisas y competentes frente a lo actualmente establecido, como el tamiz prenatal mediante ultrasonido, con

marcadores bioquímicos y el DNAfl, que pueda estar al alcance de los sistemas de salud y la población de riesgo, y que además, provea de más información útil al clínico en el diagnóstico y seguimiento de sus pacientes, en este caso la mujer gestante y su hijo.

CAPÍTULO IX

9. ANEXOS

9.1 Carta de consentimiento informado

Formato de Consentimiento Informado escrito. Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" Universidad Autónoma de Nuevo León	
CONSENTIMIENTO INFORMADO	
Título del Estudio	Diagnóstico prenatal no invasivo de aneuploidias fetales a partir de la determinación del perfil proteómico del suero materno.
Nombre del Investigador Principal	Dra. Laura E. Martínez de Villarreal
Institución	Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González. Universidad Autónoma de Nuevo León"
Servicio/Departamento	Genética
Teléfono de Contacto	(81) 8348-3704
Persona de Contacto	Dra. Graciela Areli Lopez Uriarte

Esta forma de consentimiento informado puede contener palabras que usted no entienda. Por favor pídale a su médico del estudio o al personal del estudio que le explique cualquier palabra o información que no le quede clara. Su participación en este estudio es voluntaria. Es importante que lea y entienda la siguiente explicación de los procedimientos propuestos. Este documento describe el propósito, los procedimientos, beneficios, riesgos conocidos, molestias, precauciones del estudio incluyendo la duración y la naturaleza de su participación. También describe las terapias o tratamientos alternativos conocidos que pueden estar disponibles y su derecho a retirarse del estudio en cualquier momento. No se pueden dar garantías respecto a los resultados del estudio de investigación. Para ingresar al estudio, Usted como sujeto debe de firmar y fechar este documento con la presencia de dos testigos y finalmente recibirá una copia del mismo.

1.- PROPOSITO DEL ESTUDIO

El diagnóstico de las alteraciones en el número de cromosomas de un bebé antes de que nazca se basa en el cálculo de riesgo por la edad materna, algunos marcadores bioquímicos en sangre de la madre durante el embarazo y por imágenes de ultrasonido fetal. Si este riesgo es alto, su médico le recomendará realizar una prueba invasiva (por ejemplo, una punción del líquido amniótico) para obtener células provenientes del feto con el objetivo de contar y analizar los cromosomas, confirmando o descartando así

Formato de Consentimiento Informado escrito. Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" Universidad Autónoma de Nuevo León	
2.- CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION	
El médico del estudio verificará que Usted cumpla con los siguientes requisitos antes de considerar su ingreso al estudio de investigación.	
Inclusión.	
Casos	
• Mujeres en el 2º trimestre del embarazo con sospecha prenatal por hallazgos ultrasonográficos y/o marcadores bioquímicos de feto con alteración en el número de cromosomas, que lleven control prenatal. Que aprueben su participación con su firma en el consentimiento informado.	
Controles	
• Mujeres embarazadas con feto euploide, en el 2º trimestre, que lleven control prenatal médico y ultrasonográfico; y que autoricen bajo consentimiento informado su participación en el estudio.	
• Mujeres no embarazadas, sanas equiparadas en edad y raza con el grupo de estudio y el grupo control de embarazadas. Que autoricen su participación, bajo firma de consentimiento informado.	
Exclusión	
• Presencia de enfermedad crónica o aguda al momento del estudio.	
• Evidencia ultrasonográfica de múltiples malformaciones fetales no relacionadas con alguna alteración en el número de cromosomas.	
• Embarazo múltiple.	
• Exposición a teratógenos.	
Eliminación	
• Muestra sanguínea insuficiente o en malas condiciones.	
• Mujeres que retiren su consentimiento informado para participar en el estudio.	
• Mujeres sin reporte ultrasonográfico físico que describa las alteraciones.	
• Mujeres cuyo historial clínico y datos demográficos estén incompletos.	

Formato de Consentimiento Informado escrito. Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" Universidad Autónoma de Nuevo León	
3.- MEDICAMENTO/DISPOSITIVO DE ESTUDIO	
Describa en qué consiste el medicamento/dispositivo lenguaje claro, libre de tecnicismos	
4.- PROCEDIMIENTOS	
Se recibirán pacientes del servicio de ginecología y obstetricia del Hospital Universitario que cumplan con los criterios de inclusión, se llenará una hoja con datos demográficos y médicos de las participantes.	
Se tomará una muestra de sangre periférica para luego obtener el suero y realizar el perfil proteómico del paciente por medio de un UPLC MS/MS	
Se analizarán los datos por medio de cromatografías determinando de manera comparativa si existen diferencias cualitativas y cuantitativas en el proteoma del grupo control y el grupo de estudio.	
5.- TERAPIAS ALTERNATIVAS	
Describa los criterios de inclusión y exclusión con un lenguaje claro, libre de tecnicismos	
6.- RIESGOS Y MOLESTIAS	
Riesgo mínimo invasivo correspondiente a la toma de muestra de sangre periférica.	
7.- POSIBLES BENEFICIOS	
Usted puede verse beneficiado por su participación en este estudio, aunque no hay garantías de que tenga un beneficio directo por participar en este estudio.	
Describa que posibles beneficios tendrá el Sujeto en Investigación	
8.- NUEVOS HALLAZGOS	
El médico del estudio le informará a usted o a su representante legar acerca de cualquier hallazgo significativo que se desarrolle durante el transcurso de este estudio que pudiera afectar el deseo de seguir participando en este estudio. Usted tiene el derecho de conocerla y tomar la decisión si continúa o no en el estudio.	
9.- RETIRO Y TERMINACIÓN	
Su participación es estrictamente voluntaria. Si desea suspender su participación, puede hacerlo con libertad en cualquier momento. Si elige no	

Formato de Consentimiento Informado escrito. Facultad de Medicina y Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González" Universidad Autónoma de Nuevo León	
10.- COSTOS, REEMBOLSOS Y PAGOS	
Los medicamentos, procedimientos y pruebas relacionadas con el estudio no tendrán ningún costo. Sin embargo puede incurrir en gastos propios a la atención que normalmente recibiría. Describa si el paciente recibirá algún tipo de reembolso por concepto de su participación	
11.- CONFIDENCIALIDAD/EXPEDIENTE CLINICO	
Si acepta participar en la investigación, el médico del estudio recabará y registrará información personal confidencial acerca de su salud y de su tratamiento. Esta información no contendrá su nombre completo ni su domicilio, pero podrá contener otra información acerca de Usted, tal como iniciales y su fecha de nacimiento. Toda esta información tiene como finalidad garantizar la integridad científica de la investigación. Su nombre no será conocido fuera de la Institución al menos que lo requiera nuestra Ley.	



Formato de Consentimiento Informado escrito.
Facultad de Medicina y Hospital Universitario
"Dr. José Eleuterio González"
Universidad Autónoma de Nuevo León

5

Usted tiene el derecho de controlar el uso de sus datos personales de acuerdo a la Ley Federal de Protección de datos Personales en Posición de Particulares, así mismo de solicitar el acceso, corrección y oposición de su información personal. La solicitud será procesada de acuerdo a las regulaciones de protección de datos vigentes. Sin embargo, cierta información no podrá estar disponible hasta que el estudio sea completado, esto con la finalidad de proteger la integridad del Estudio.

La Facultad de Medicina y Hospital Universitario así como el Investigador serán los responsables de salvaguardar la información de acuerdo con las regulaciones locales. Usted tiene el derecho de solicitar por escrito al medico un resumen de su expediente clínico.

La información personal acerca de su salud y de su tratamiento del estudio podrá procesarse o transferirse a terceros en otros países para fines de investigación y de reportes de seguridad, incluyendo Agencias reguladoras (Secretaría de Salud SSA) locales así como a comité de Ética en Investigación y de Investigación de nuestra Institución.

Para los propósitos de este estudio, autoridades sanitarias como Secretaría de Salud y Comité de Ética en Investigación y de Investigación de nuestra Institución podrán inspeccionar el expediente clínico, incluso los que fueron recabados antes de su inicio de participación, los cuales pueden incluir su nombre, domicilio y otra información personal. En caso necesario estas auditorías o inspecciones podrán hacer fotocopias de parto o de todo su expediente clínico. La razón de esto es asegurar que el estudio se está llevando a cabo apropiadamente con la finalidad de salvaguardar sus derechos como pacientes en investigación.

Los resultados de este estudio de investigación podrán presentarse en reuniones o en publicaciones.

La información recabada durante este estudio será recopilada en bases de datos del investigador, los cuales podrán ser usados en otros estudios en el futuro. Estos datos no incluirán información médica personal confidencial. Se mantendrá el anonimato.

Al firmar este documento, Usted así como su representante autorizan el uso y revelaciones de la información acerca de su estado de salud y tratamiento identificado en esta forma de consentimiento. No perderá ninguno de sus



Formato de Consentimiento Informado escrito.
Facultad de Medicina y Hospital Universitario
"Dr. José Eleuterio González"
Universidad Autónoma de Nuevo León

6

derechos legales como sujeto de investigación. Si hay cambios en el uso de su información, su médico le informará.

12.- INTERVENCIÓN DEL MEDICO FAMILIAR

Se le informará a su médico de cabecera acerca de su participación en este estudio, enviándole la información médica pertinente si lo solicita así como cualquier información médica relevante.

Para que los médicos de la Institución conozcan de su participación en el estudio, los expedientes clínicos cuentan con un identificador para que el médico de cabecera se ponga en contacto con el Investigador.

13.- COMPENSACION Y TRATAMIENTO DE LESIONES

Si se enferma o se lesiona debido a una complicación o adversidad que sea resultado directo del uso del medicamento/dispositivo o procedimiento en estudio, deberá Usted notificar a su Médico para que el proporcione los cuidados necesarios para el tratamiento de dicha complicación. El tratamiento recibido no tendrá ningún costo y será cubierto por la Institución, así como la indemnización a la cual tendría derecho en caso de requerirla.

Si desea mayor información podrá contactar Lic. Antonio Zapata de la Riva al teléfono (81) 83294050 exts 2870 a 2874.

13.- DECLARACIÓN

Reconozco que me han dado la oportunidad de hacer preguntas relacionadas al estudio de investigación y que todas estas se me han respondido de manera clara y precisa.

Entiendo además si tengo preguntas relacionadas al estudio, así como en el caso de lesiones o complicaciones deberá de notificar de inmediato al investigador con la siguiente información de contacto.

Nombre del Investigador Principal	Dra. Laura E. Martínez de Villarreal
Teléfono de Contacto	8348-3704
Teléfono de emergencias	8389-1111



Formato de Consentimiento Informado escrito.
Facultad de Medicina y Hospital Universitario
"Dr. José Eleuterio González"
Universidad Autónoma de Nuevo León

7

Además entiendo que el Comité de Ética en Investigación cuenta con un numero de emergencias para estos casos y que podré contactarlos para notificar de una complicación.

Urgencias Médicas. Comité de Ética en Investigación. Teléfono 044-8119085882

En caso de tener alguna pregunta relacionada a mis derechos como sujeto de investigación de la Facultad de Medicina podrá contactar al Comité de Ética en Investigación y de Investigación de nuestra Institución al Presidente, Dr. José Gerardo Garza Leal, o al Representante legal de los sujetos de Investigación al Lic Antonio Zapata de la Riva.

Comité de Ética en Investigación y de Investigación

Av. Francisco I Madero Pte. s/n y Av. Gonzalitos, Col. Mitras Centro, 66460 en Monterrey, Nuevo León México.

Teléfonos: 81-83294050 exts 2870 a 2874

www.investigacion-medunal.com

email: investigacionclinica@meduanl.com

Al firmar este consentimiento reconozco que mi participación es voluntaria y que puedo negarme a participar o suspender mi participación en cualquier momento sin sanciones ni pérdidas de los beneficios a los que de otro modo tengo derechos.

Acepto además que mi información personal de mi salud puede utilizarse y transferirse para nuevos estudios de investigación clínica con la finalidad de brindar más información y así contar con nuevas opciones de tratamiento. Entiendo que mi información puede ser auditada o inspeccionada por agencias reguladoras como la Secretaría de Salud así como por la misma Institución. Se me entrega una copia del consentimiento informado.

13.- FIRMAS

Fecha _____ Firma de la Sujeto _____ Nombre en letra de molde _____

Fecha _____ Firma del Primer Testigo _____ Nombre en letra de molde _____



Formato de Consentimiento Informado escrito.
Facultad de Medicina y Hospital Universitario
"Dr. José Eleuterio González"
Universidad Autónoma de Nuevo León

8

Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección _____

Fecha _____ Firma del Segundo Testigo _____ Nombre en letra de molde _____

Relación del Primer Testigo con la Sujeto del Estudio Dirección _____

II. ASEGURAMIENTO DEL INVESTIGADOR O DEL MIEMBRO DEL EQUIPO

He discutido lo anterior con esta persona. A mi más leal saber y entender, el sujeto está proporcionando su consentimiento tanto voluntariamente como de una manera informada, y él/ella posee el derecho legal y la capacidad mental suficiente para otorgar este consentimiento.

Fecha _____ Firma de la Persona que Otorga el Consentimiento Investigador Principal _____ Nombre en letra de molde _____

9.2 Hoja de recolección de datos

Hoja de recolección de datos	
Folio: _____	
"Diagnóstico prenatal no invasivo de aneuploidías fetales mediante determinación del perfil proteómico en suero materno"	
Nombre: _____	Edad: _____
Lugar y fecha de nacimiento: _____	
Dirección: _____	Teléfono: _____
Hospital de procedencia: _____	Semanas de gestación: _____
Lugar, fecha y hora de amniocentesis: _____	
Lugar, fecha y hora de toma de muestra de sangre: _____	
Nivel socioeconómico (salarios): 1. Ninguno 2. Menos que el mínimo 3. El mínimo 4. Más que el mínimo	Educación: 1. Analfabeta 2. Primaria incompleta 3. Primaria completa 4. Secundaria incompleta 5. Secundaria completa 6. Carrera Técnica 7. Preparatoria 8. Licenciatura 9. Posgrado
Estado civil: 1. Soltera 2. Casada 3. Unión libre 4. Divorciada 5. Viuda 6. Separada	Religión: 1. Católica 2. Bautista 3. Cristiana 4. Testigo de Jehová 5. Otro: _____
Ocupación: 1. Estudiante 2. Hogar 3. Empleada 4. Obrera 5. Comerciante 6. Profesionalista 7. Otro: _____	
Menarca (años): _____ Edad de primer embarazo: _____ Método de planificación familiar: _____	
Embarazo actual: 1. Espontáneo 2. Inseminación artificial 3. Técnica de reproducción asistida (FIV, ICSI)	
Nombre de la Pareja: _____ Edad: _____ Lugar de Origen: _____ Enfermedades: _____ Medicamentos: _____	
Familiares afectados con Sx. Down: _____ Hijo previo con malformaciones congénitas: _____ 1. Si (quien: _____) 1. Si (cuáles: _____) 2. No 2. No	
Gestas: _____ Paras: _____ Cesáreas: _____ Abortos: _____ E. molar: _____ E. ectópico: _____ Edad de la 1ª gesta: _____ No. De gesta actual: _____ Periodo intergenésico (años): _____ Peso habitual (kg): _____ Peso actual (kg): _____ Talla (m): _____ IMC: _____	
Enfermedades actuales: 1. Diabetes 2. Hipertensión arterial crónica 3. Enfermedad autoinmune 4. Preeclampsia 5. Otra: _____	
Medicamentos actuales: _____	
Fecha y hallazgos del ultrasonido: _____	
Resultado cariotipo fetal: _____	
Observaciones: _____ _____ _____	

CAPÍTULO X

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Hassold T, Hall H, Hunt P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Hum Mol Genet*, 16(2): R203-R208.
2. Cereceda A, Carey JC, (2012). The trisomy 18 syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7:81
3. Creasy MR, Crolla JA. (1974). Prenatal mortality of trisomy 21 (Down syndrome). *Lancet*. i:473.
4. Mutchinick O, Lisker R, Babinsky V. (1991). Riesgo para Síndrome de Down por bienios y quinquenios de edad materna en la población mexicana; *Bol Med Hosp. Infant Mex*; 48:534-7.
5. Hook EB. (1992). Ultrasound and fetal chromosome abnormalities. *Lancet*. Oct 31;340(8827):1109.
6. Presson AP, Partyka G, Jensen KM, Devine OJ, Rasmussen SA, McCabe LL, McCabe ER. (2013). Current estimate of Down Syndrome population prevalence in the United States. *J Pediatr*. Oct;163(4):1163-8.
7. World Health Organization, (2012). Born Too Soon: The Global Action Report on Preterm Birth. 22 marzo 2019, de WHO Sitio web: https://www.who.int/pmnch/media/news/2012/preterm_birth_report/en/
8. Nicolaides KH, Spencer K, Avgidou K, Faiola S, Falcon O. (2005). Multicenter study of first-trimester screening for trisomy 21 in 75 821 pregnancies: results and estimation of the potential impact of individual risk-orientated two-stage first trimester screening. *Ultrasound Obstet Gynecol.*; 25(3): 221-6.
9. Grether González P, Aguinaga Ríos M. (2009). Tamiz genético prenatal: marcadores bioquímicos del primer y segundo trimestres. *Ginecol Obstet Mex*; 77(2): S27-S46.
10. Souter VL, Nyberg DA. (2001). Sonographic Screening for Fetal Aneuploidy: First Trimester, *J Ultrasound Med*. 20:775–790.
11. Gravholt CH, Juul S, Naeraa RW, Hansen J. (1996). Prenatal and postnatal prevalence of Turner's syndrome: a registry study. *BMJ*; 312(7022): 16–21.
12. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, Rai V, Sargent IL, Redman CW, Wainscoat JS. (1997). Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet*; 350(9076):485-7.

13. Devers PL, Cronister A, Ormond KE, Facio F, Brasington CK, Flodman PJ. (2013). Noninvasive prenatal testing/noninvasive prenatal diagnosis: the position of the National Society of Genetic Counselors. *Genet Couns.* Jun;22(3):291-5.
14. Guía de práctica clínica: Diagnóstico prenatal de los defectos congénitos. Cribado de anomalías cromosómicas. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. *Diagn Prenat.* 2013;24:57-72.
15. Hörmansdörfer C, Corral A, Scharf A, et al. (2010). Comparación de los métodos actuales de cribado prenatal del síndrome de Down. *Rev Esp Salud Pública;* 84: 43-51
16. González-Buitrago JM, Ferreira L, Muñiz MC. (2008). Proteómica clínica y nuevos biomarcadores en líquidos biológicos. *Med Clin;* 131(11): 426-434.
17. Kolialexi A, Tsangaris GT, Mavrou A. (2009). Proteomics in prenatal diagnosis, , *Expert Review of Proteomics,* 6:2, 111-113.
18. Graves PR, Haystead TA. (2002). Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev.* Mar;66(1):39-63.
19. Dunn MJ. (2016). Proteomics Clinical Applications Reviews. *Proteomics Clin Appl.* Apr;10(4):301.
20. Liberatori S, Bini L, De Felice C, Magi B, Marzocchi B, Raggiaschi R, et al. (1997). A two-dimensional protein map of human amniotic fluid at 17 weeks' gestation. *Electrophoresis;*18:2816–22.
21. Wang TH, *et al.* (2005). Rapid detection of fetal aneuploidy using proteomics approaches on amniotic fluid supernatant, *Prenat Diagn;* 25: 559–566
22. Tsangaris GT, Karamessinis P, Kolialexi A, Garbis SD, Antsaklis A, Mavrou A, Fountoulakis M. (2006). Proteomic analysis of amniotic fluid in pregnancies with Down syndrome. *Proteomics.* Aug;6(15):4410-9.
23. Nagalla SR, Canick JA, Jacob T, *et al.* (2007). Proteomic analysis of maternal serum in Down syndrome: identification of novel protein biomarkers. *J Proteome Res;* 6: 1245-1257.
24. Kolialexi A, Tsangaris G, Papantoniou N, *et al.* (2008). Application of proteomics for the identification of differentially expressed protein markers for Down syndrome in maternal plasma. *Prenat Diagn;* 28: 691-698.
25. Kolla, V., Jenö, P., Moes, S., Tercanli, S., Lapaire, O., Choolani, M., & Hahn, S. (2009). Quantitative proteomics analysis of maternal plasma in Down syndrome pregnancies using isobaric tagging reagent (iTRAQ). *Journal of biomedicine & biotechnology,* 2010, 952047.
26. Kang Y, Dong X, Zhou Y, Cheng Y, Hu R, Su C, Jin H, Liu X, Ma D, Tian W, Li X. (2012). Identification of novel candidate maternal serum protein markers for Down syndrome by integrated proteomic and bioinformatic analysis. *Prenat Diagn.* Mar;32(3):284-92.
27. Heywood W, Mills K, Wang D, Hogg J, Madgett TE, Avent ND, Chitty LS. (2012). Identification of new biomarkers for Down's syndrome in maternal plasma. *J Proteomic.* May 17;75(9):2621-8.

28. López Uriarte GA, Medina Aguado MM, Torres de la Cruz VM, Sepúlveda González G, Villagómez Martínez G, Martínez Garza LE. (2014). Determination of Potencial Biomarkers for Prenatal Diagnosis of Chromosomopathies, Birth Defects Research (Part A). 100:433. p53.
29. Sullivan KD, *et al.* (2017). Trisomy 21 causes changes in the circulating proteome indicative of chronic autoinflammation. Sci Rep. Nov 1;7(1):14818.
30. Kolialexi A, *et al.* (2010). Potential Biomarkers for Turner in Maternal Plasma: Possibility for Noninvasive Prenatal Diagnosis, Journal of Proteome Research; 9, 5164–5170.
31. Narasimhan K, Lin SL, Tong T, Baig S, Ho S, Sukumar P, Biswas A, Hahn S, Bajic VB, Choolani M. (2013). Maternal serum protein profile and immune response protein subunits as markers for non-invasive prenatal diagnosis of trisomy 21, 18, and 13. *Prenat Diagn.*;33(3):223-31.
32. Hsu TY, *et al.* (2016). Two-Dimensional Differential Gel Electrophoresis to Identify Protein Biomarkers in Amniotic Fluid of Edwards Syndrome (Trisomy 18) Pregnancies. PLoS One. 11;11(1): e0145908.
33. Koster MP, *et al.* (2009). Bead-based multiplexed immunoassays to identify new biomarkers in maternal serum to improve first trimester Down syndrome screening, *Prenat Diagn*;29(9):857-62.
34. The GeneCards human gene database. (2019). *human genes*. enero 16, 2019, de Weizmann Institute of Science. Sitio web: <https://www.genecards.org/>
35. Engels H, Eggermann T, Caliebe A, Jelska A, Schubert R, Schöler HM, Panasiuk B, Zaremba J, Latos-Bieleńska A, Jakubowski L, Zerres KP, Schwanitz G, Midro AT. (2008). Genetic counseling in Robertsonian translocations der (13;14): frequencies of reproductive outcomes and infertility in 101 pedigrees. *Am J Med Genet A.* ,15;146A(20):2611-6
36. Sobey CG, Judkins CP, Sundararajan V, Phan TG, Drummond GR, Srikanth VK. (2015). Risk of Major Cardiovascular Events in People with Down Syndrome. PLoS One. Sep 30;10(9):e0137093.
37. Derzy Z, Prohaszka Z, Rigós J, Fust G, Molvarec A. (2010). Activation of the complement system in normal pregnancy and preeclampsia. *Mol Immunol*; 47:1500- 1506.
38. Rull K, Nagirnaja L, Laan M. (2012). Genetics of Recurrent Miscarriage: Challenges, Current Knowledge, Future Directions *Front Genet*; 3: 34.
39. Yao, Y, *et al.* (2014). Screening and identification of potential predictive biomarkers for Down's syndrome from second trimester maternal serum. *Expert Rev Proteomics*,12, 97–107.
40. Rafii MS, Lukic AS, Andrews RD, Brewer J, Rissman RA, Strother SC, Wernick MN, Pennington C, Mobley WC, Ness S, Matthews DC. (2017). PET Imaging of Tau Pathology and Relationship to Amyloid, Longitudinal MRI, and Cognitive Change in Down Syndrome: Results from the Down Syndrome Biomarker Initiative (DSBI). *J Alzheimers Dis*;60(2):439-450.

41. Mange A, *et al.* (2008). Proteomic profile determination of autosomal aneuploidies by mass spectrometry on amniotic fluids, *Proteome Science*, 6:1.
42. Atton, G., Gordon, K., Brice, G., Keeley, V., Riches, K., Ostergaard, P., Mortimer, P. Mansour, S. (2015). The lymphatic phenotype in Turner syndrome: an evaluation of nineteen patients and literature review. *European journal of human genetics: EJHG*, 23(12), 1634-9.
43. Avent ND. (2013). Maternal plasma biomarkers for down syndrome: present and future. *Drugs Today*;49(2):145-52.
44. Yu B, Zhang B, Wang J, Wang QW, Huang RP, Yang YQ, Shao SH. (2012). Preliminary proteomic-based identification of a novel protein for Down's syndrome in maternal serum. *Exp Biol Med*. May;237(5):530-9
45. Wilkins MR, *et al.* (1996). From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (NY)* ;14(1):61-5.
46. De Rubens-Figueroa J, Marino B. (2014). Paciente con anomalía de Ebstein y síndrome de Down. Una extraña combinación. *Acta Pediatr Mex*;35:218-221.
47. Garanzo-Asensio, María, *et al.* (2018). Identification of prefrontal cortex protein alterations in Alzheimer's disease. *Oncotarget*. Feb 16; 9(13): 10847–10867.
48. Basile JR, *et al.* (2004). Class IV Semaphorins Promote Angiogenesis by Stimulating Rho-Initiated Pathways through Plexin-B, *Cancer research*, 64, 5212–5224.
49. Yuan Yao, Yang Liao, Mei Han, Sheng-Lan Li, Juan Luo & Bo Zhang. (2016). Two kinds of common prenatal screening tests for Down's syndrome: a systematic review and meta-analysis, *Nature Scientific Reports*. Article number: 18866.
50. Hernández, Frank J., & Botero Hincapié, Juliana Andrea. (2012). Aptámeros: agentes diagnósticos y terapéuticos. *Iatreia*, 25(2), 159-168.